

Aus dem Fachbereich der Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Institut für Biochemie I – Molekulare Bioenergetik  
am Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie

**„Heterologe Expression von Antikörperfragmenten  
zur Kristallisation von Membranproteinen“**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

**Juliane Werner**

aus Ludwigslust

Frankfurt am Main 2006

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. U. Brandt

Korreferent: Prof. Dr. G. Oremek

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2007

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
	NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) der Atmungskette	1
	Die Atmungskette	1
	Funktion und Aufbau der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	3
	Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase von <i>Y. lipolytica</i>	5
1.2	Mitochondriale Erkrankungen, insbesondere der Atmungskette	6
1.3	Membranproteine	8
1.3.1	Kristallisation von Membranproteinen, vermittelt von Antikörperfragmenten	9
1.4	Rekombinante Antikörperfragmente	10
1.5	Expression rekombinanter Antikörper in <i>Escherichia coli</i>	12
1.6	Bedeutung der Affinitätstags an VH und VL	13
1.6.1	Strep-tag C-terminal an VH	14
1.6.2	c-myc-tag C-terminal an VL	14
1.7	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
	Methoden - molekulargenetisch -	17
	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	17
	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen und Transformation	17
	Mini-Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	17
	Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	18
	Vorbereitung der m-RNA	18
	PCR und Klonieren von PCR-Produkten	18
	Primer	19
2.1.2.4	Verdau von Plasmid-Template-DNA	20
2.1.2.5	Phosphorylierung des PCR-Produktes	20
2.1.2.6	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	20
2.1.2.7	Ligation	20
	Agarosegelelektrophorese von DNA	20
	Ethanol-Präzipitation	21
	Sequenzierung	21

Restriktion der DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
Punktmutagenese	22
Methoden - proteinchemisch -	23
SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	23
Western- Blot	23
Immunologische Detektion	24
ECL-Immunoblot	24
Strep-Tag-Nachweis	24
Analytische und präparative Expression der Fv-Fragmente	25
Reinigung der Fv-Fragmente	26
2.2.4.2    Bindungsversuche der Fv-Fragmente an Komplex I mit Hilfe der FPLC-Gelfiltration	26
2.2.5    Proteinbestimmung nach Lowry	27
2.2.6    Aktivitätstest (HAR)	27
2.2.7    Kristallisationsbedingungen für Komplex I ( <i>Yarrowia lipolytica</i> ) mit Fv (Y34C10)	28
2.2.7.1    Methode des hängenden Tropfen („hanging drop“)	28
2.3.    Materialien	29
<b>3</b> <b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1    Klonierung- und Expressionsstrategie	34
3.2    Y30C12	34
3.2.1    RT-PCR	34
3.2.2    Klonierung und Expressionsniveau	35
3.2.3    Punktmutagenese des Klones Y30C12	36
3.2.4    Expressionsniveau Y30C12, SLK-pASK68; Vergleich nativ-mutiert	37
3.3    Y34C10	39
3.3.1    RT-PCR	39
3.3.2    Klonierung und Testexpression von Fv Y34C10	39
3.4    Y34C10, SLK-pASK68	41
3.4.1    Detektion des Strep-Tag an der schweren Kette	41
3.4.2    Detektion des c-myc-Tag an der leichten Kette	41
3.4.3    Reinigung und FPLC-Gelfiltration der Fv-Fragmente von Y34C10	42

---

3.5	Bindungsnachweis des Fv Y34C10 an Komplex I	44
3.6	Kristallisation und Bedingungen	45
3.6.1	Kristallisationsversuch mit den Fv-Fragment Y34C10	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Y30C12-Bindungsort an Komplex I	47
4.2	Y34C10-Bindungsort in Bezug auf die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	48
4.3	Sequenzanalyse	50
4.4	Kristallisation von Membranproteinen	52
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>54</b>
5.1	Verzeichnis der Abkürzungen	54
5.2	Verzeichnis der Abbildungen	56
5.3	Verzeichnis der Tabellen	58
5.4	Sequenzvergleich der 49 kDa-Untereinheit aus verschiedenen Organismen	58
5.5	Darstellung des Vektors pCR2.1	61
5.6	Schema- und Sequenzdarstellung des Plasmides pASK68	61
5.7	Atmungsdefekte unter klinischen Aspekten	63
5.7.1	Mögliche Symptome verschiedener Organsysteme bei defekter Atmungskette	63
5.7.2	Klinische Symptome und Syndrome in Zusammenhang mit spezifischen Komplex-Defekten	64
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>78</b>
7.1	Zusammenfassung und Ausblick	78
7.2	Abstract and Perspectives	80



## 1 Einleitung

### 1.1 NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) der Atmungskette

#### 1.1.1 Die Atmungskette

Einer der zentralen eukaryontischen Stoffwechselprozesse ist die oxidative Phosphorylierung, an der eine Reihe von Enzymen beteiligt sind, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Sie beinhaltet eine Elektronentransportkette über eine Reihe von membrangebundenen Multiproteinkomplexen.

Die Atmungskette besteht aus vier Proteinkomplexen (Tabelle 1), die in den Mitochondrien der meisten Eukaryonten und der Zellmembran vieler Bakterien liegen. Die Enzymkomplexe NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), die Succinat: Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), die Ubihydrochinon: Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) durchspannen die innere Mitochondrienmembran und fungieren als Elektronencarrier.

Die Elektronen treten unter anderem in Form von NADH über den Komplex I (NADH-Oxidoreduktase) in die Atmungskette ein und werden nun auf den lipophilen Elektronencarrier Ubichinon übertragen. NADH wird vor allem während der  $\beta$ -Oxidation, im Citratcyclus und durch den Pyruvat Dehydrogenase Komplex gebildet. Der Elektronentransfer wird von verschiedenen redoxaktiven prosthetischen Gruppen im Komplex I katalysiert (Brandt, 2006). Die dabei frei werdende Energie benutzt das Enzym, um vier Protonen von der Membranninnenseite auf die Außenseite (periplasmatischer Raum) zu transportieren (Wikström, 1984, Zwicker et al., 2006). Ubichinon, eine hydrophobe Verbindung, die frei in der inneren Mitochondrienmembran diffundieren kann, transportiert ebenfalls die von dem Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase) übertragenen Elektronen und reicht diese schließlich an den Komplex III (Cytochrom c Reduktase) weiter. Von dort gelangen die Elektronen über Cytochrom c, welches membranassoziiert im Intermembranraum liegt, schließlich zur Cytochrom c Oxidase (Komplex IV).

In der Elektronentransportkette wird die Redoxenergie der Reduktionsäquivalente stufenweise vermindert und die freiwerdende Energie in den Komplexen I, III und IV dazu benutzt, Protonen von der Matrixseite der Innenmembran in den Intermembranraum zu pumpen (Mitchell, 1966). Der dabei entstehende Protonengradient bedingt über der Membran ein elektrochemisches Membranpotential und einen pH-Gradienten (Mitchell, 1966; Boyer et al., 1977). Die Energie des Gradienten wird für die Synthese von ATP in der ATP-Synthase verwendet, wobei Protonen kontrolliert in die Matrix zurückfließen (Bild 1), bei Eukaryonten über die innere mitochondriale Membran, bei Prokaryonten über die

Zellmembran. Über diesen Protonengradienten sind Oxidation und Phosphorylierung über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt.

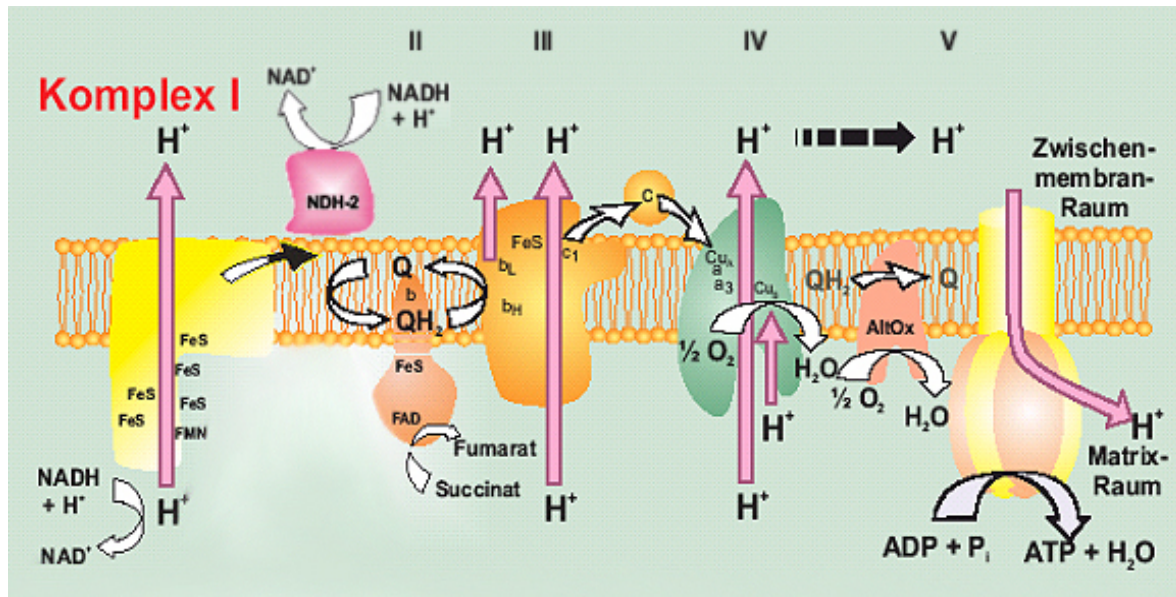


Bild 1: Topologisches Schema des mitochondrialen Protonen- und Elektronentransportes von *Yarrowia lipolytica*.

Die vier elektronenübertragenden Atmungskomplexe, sind I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase), II (Succinat:Dehydrogenase), III (Cytochrom c-Reduktase), IV (Cytochrom c-Oxidase). Der Komplex V, auch ATP-Synthase, nutzt den von den Komplexen I, III und IV aufgebauten Protonengradienten zur ATP-Synthese.

Die Atmungskette von *Y. lipolytica* besitzt zusätzlich eine externe, alternative NADH-Dehydrogenase (NDH-2) und eine alternative Ubihydrochinon-Oxidoreduktase (Alt-Ox).

Durch die weißen Pfeile wird die Richtung des Elektronentransportes, durch die violetten, die des Protonentransportes aufgezeigt.

FeS: Eisen-Schwefel Zentren; FMN: Flavinmononukleotid, FAD: Flavinadenindinukleotid, NAD<sup>+</sup>:

Nikotinsäureamidadenindinukleotid; NADH: Hydronikotinsäureamidadeninnukleotid; Q: Ubichinon; QH<sub>2</sub>: Ubihydrochinon; b: Häm b; b<sub>H</sub>: „high potential“ Häm b; b<sub>L</sub>: „low potential“ Häm b; a<sub>3</sub>: Häm a<sub>3</sub>; c: Cytochrom c; c<sub>1</sub>: Cytochrom c<sub>1</sub>



Komplex No.	Bezeichnung	Molekulargewicht (kDa)	Untereinheiten *	Prosthetische Gruppe(n)	Protonen-transport
I	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase	1000	46 (7)	FMN 8 Eisen-Schwefel-Zentren (Fe-S-Z)	4H <sup>+</sup> /2e <sup>-</sup>
II	Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase	125	4-6 (0)	FAD 3 Fe-S-Z Häm b	-
III	Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase	250	11(1)	2 Häm b 1 Häm c <sub>1</sub> 1 Fe-S-Z	Q-Cyclus 2H <sup>+</sup> /2e <sup>-</sup>
IV	Cytochrom c-Oxidase	220	13 (3)	1 Häm a 1 Häm a <sub>3</sub> 2 Cu-Zentren	4H <sup>+</sup> /2e <sup>-</sup>

Tabelle 1: Die Enzymkomplexe der Atmungskette

\*: Die Zahlen in den Klammern geben die mitochondrial kodierte Untereinheiten an (entnommen aus Löffler-Petrides: „Biochemie und Pathobiochemie“, 6.Aufl. (Springer-Verlag), S.498, verändert)

### 1.1.2 Funktion und Aufbau der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase

Mit bis zu 46 verschiedenen Untereinheiten, mehr als 8000 Aminosäuren und einer Gesamtmasse von 1000 kDa ist der eukaryontische Komplex I einer der größten Membranproteinkomplexe (Skehel, Fearnley und Walker, 1998; Walker, 1992), welcher allerdings trotz zahlreicher Untersuchungen in seiner Struktur und Funktion noch immer nicht verstanden ist.

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase besteht aus verschiedenen Modulen, die mit einigen Transportproteinen (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter), Hydrogenasen (NiFe-Hydrogenase) und Diaphorasen verwandt sind. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von negativ gefärbten Einzelpartikeln des Komplex I von *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass die NADH:Dehydrogenase eine zweiteilige, L-förmige Struktur besitzt (Weiss et al., 1991a, Hofhaus et al., 1991). Diese Form des Komplex I konnte später bei *E. coli*, *B. taurus* und *Y. lipolytica* mit einigen Abweichungen in den Details bestätigt werden (Guènebaut et al., 1998; Grigorieff, 1998; Djafarzadeh et al., 2000; Radermacher et al., 2006) und ist inzwischen allgemein anerkannt (Weiss et al., 1991a; Walker 1992; Friedrich et al., 1995; Brandt, 1997; Grigorieff, 1999; Sazanov und Walker, 2000).

Komplex I setzt sich aus zwei Hauptsegmenten, einem wasserlöslichen peripheren, vertikal in die mitochondriale Matrix hineinragendem und einem horizontalen, in der inneren mitochondrialen Membran gelegenen Segment zusammen (Bild 2, 3) (Galante und Hatefi, 1978, 1979; Hofhaus et al., 1991; Walker, 1992). Beide Arme werden unabhängig voneinander assembliert und anschließend zum Gesamtkomplex zusammengefügt (Tuschen

et al., 1990; Nehls et al., 1992; Schulte und Weiss, 1995). Mit elektronenmikroskopischen Analysen von Komplex I konnte gezeigt werden, dass der Winkel zwischen dem peripheren und dem Membranarm zwischen  $90^\circ$  und  $150^\circ$  variieren kann (Zickermann et al., 2003). Wie in dem bekannten Modell des Komplex I von *E. coli* haben beide Arme etwa die gleiche Länge von ca. 23 nm (Guènebaut et al., 1998) (Bild 2). Anhand der Überlagerung dreidimensionaler Modelle des bakteriellen und des mitochondrialen Komplexes kann vermutet werden, dass sich die zusätzlichen Untereinheiten des mitochondrialen Komplex I relativ gleichmäßig um den katalytischen Kern anordnen, den das bakterielle Enzym darstellt. In diesem Zusammenhang lässt sich spekulieren, dass diese der Stabilisierung des Enzyms dienen und ein Entweichen energiereicher Elektronen verhindern (Friedrich und Weiss, 1997; Guènebaut et al., 1998).

Der periphere Anteil, mit seiner Y-förmigen Struktur (Hinchliffe and Sazanov, 2005), trägt alle redoxaktiven Gruppen (Fearnley und Walker, 1992). Das Membransegment besteht hauptsächlich aus hydrophoben Untereinheiten inklusive derer, die von der mtDNA kodiert werden (Bild 3). Die Mindestzahl an Untereinheiten für ein funktionsfähiges Enzym beträgt 14. Diese Untereinheiten wurden sowohl in Bakterien, als auch im mitochondrialen Komplex I gefunden (Weidner et al., 1993; Friedrich, 1998). In Mitochondrien von Pilzen oder der strikt aeroben Hefe *Yarrowia lipolytica* sind etwa 40 Untereinheiten (Abdrakhmanova, persönliche Mitteilung) enthalten. In höheren Organismen z.B. beim Rind oder anderen Säugetieren sind 46 Untereinheiten vorhanden (Hirst et al., 2003). Von diesen Untereinheiten des aus Rinderherz gereinigten Komplex I werden 7 von der mtDNA kodiert und die restlichen von der Kern-DNA.

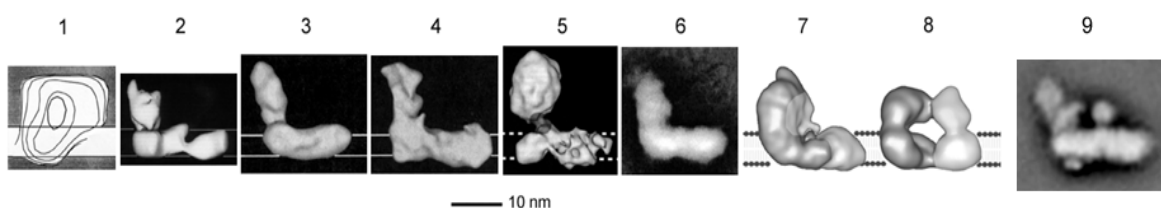


Bild 2: EM-Darstellungen und 3D-Modelle von Komplex I

1. *N. crassa* (Leonard et al., 1987)
2. *N. crassa* (Hofhaus et al., 1991)
3. *N. crassa* (Guènebaut et al., 1997)
4. *E. coli* NDH-1 (Guènebaut et al., 1998)
5. Bovine heart (Grigorieff, 1998)
6. *Y. lipolytica* (Djafarzadeha et al., 2000)
7. *E. coli* (Böttcher et al., 2002) ; 7 entspricht der inaktiven Form und 8 der aktiven Form
9. *Arabidopsis* (Dudkina et al., 2005)

### 1.1.3 Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase von *Y. lipolytica*

Die Hefe *Y. lipolytica* wurde als Modelorganismus eingeführt (Ahlers et al., 2000 a; b; Kerscher et al., 2002), da sie eine u.a. gegenüber Detergentien ausreichend stabile NADH:Ubichinon Oxidoreduktase besitzt. Das monomere Enzym hat eine Molekulare Masse von ca. 890 kDa, neigt nicht zur Aggregation und kann gut isoliert werden (Djafarzadeh et al., 2000). Als nicht pathogener, strikt aerober Organismus zeichnet sich diese Spalthefe durch eine konstant hohe Menge an Mitochondrien aus. Die hohe Frequenz homologer Rekombination, die Verfügbarkeit von replikativen Einzelkopieplasmiden, die hohe Biomasseausbeute (bis zu 100 g/l Feuchtwicht), die kurze Generationszeit, das kleine Genom mit nur wenigen Introns, die leichte Zugänglichkeit für molekularbiologische Manipulationen, z.B. einer gezielten Mutagenese und die Verfügbarkeit mehrerer genetischer Marker, welche eine positive und negative Selektion zulassen, sprechen für die Verwendung von *Y. lipolytica* zur Erforschung der mitochondrialen Atmungskette (Barth und Gaillardin, 1997).

Die Hefe enthält einen Komplex I, der von ähnlicher Größe ist wie der, welcher in anderen Eukaryonten beschrieben wurde und der nach der Isolation stabil ist. Von den 40 Untereinheiten konnten neben den sieben zentralen, kernkodierte und den sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten, hochkonservierte Untereinheiten durch Klonierung und Sequenzierung, sowie durch Massenspektrometrie der Gene identifiziert werden (Djafarzadeh et al., 2000). Diese Untereinheiten befinden sich im hydrophilen, peripheren Arm (Schulte et al., 1994, Finel et al., 1994) und werden im Rinder-Komplex I nach ihrer Größe und z.T. nach den ersten vier Aminosäuren des reifen Proteins bezeichnet (Tab. 2). Diese Untereinheiten sind zu denen des Komplex I aus *B. taurus* und *E. coli* homolog. Die primären Strukturen der sieben konservierten Untereinheiten ND1 bis ND6 und ND4L, welche im hydrophoben Membranteil des Komplexes lokalisiert sind, konnten von der kompletten Sequenz des mitochondrialen Genoms abgeleitet werden (Kerscher et al., 2001). Die sieben kernkodierte und die sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex I aus *Y. lipolytica* weisen große Ähnlichkeiten zu Komplex I Untereinheiten aus anderen pro- und eukaryontischen Organismen auf.

Gen/ Symbol	Homologes Protein in <i>B. taurus</i>	Mol. Masse des reifen Proteins	Prosthetische Gruppen
NUAM	75 kDa	75,2 kDa	N1b [2Fe2S] N4 [4Fe4S] N5 [4Fe4S]
NUBM	51 kDa	51,7 kDa	FMN N3 [4Fe4S]
NUCM	49 kDa	49,9 kDa	
NUGM	30 kDa	29,2 kDa	
NUHM	24 kDa	24,1 kDa	N1a [2Fe2S]
NUIM	TYKY	20,3 kDa	N6a [4Fe4S] N6b [4Fe4S]
NUKM	PSST	20,4 kDa	N2 [4Fe4S]
mtDNA	ND1-6, ND4L		

Tabelle 2: Konservierte, zentrale Untereinheiten des Komplex I von *Y. lipolytica* (Djafarzadeh et al., 2000, verändert)

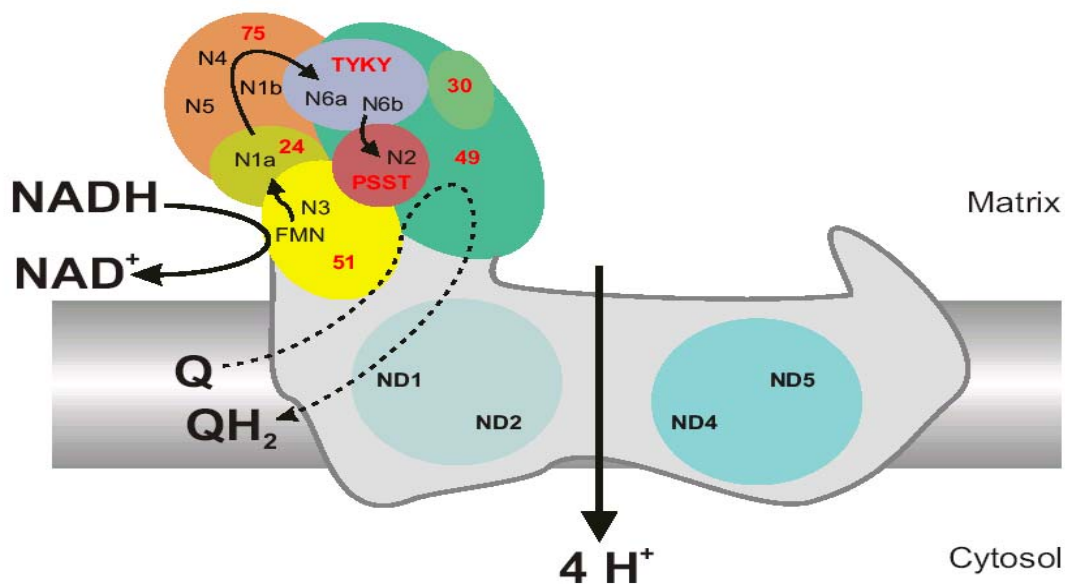


Bild 3: Komplex I mit seinen hydrophilen und hydrophoben (ND1-ND6 und ND4L) Untereinheiten

## 1.2 Mitochondriale Erkrankungen, insbesondere der Atmungskette

Mitochondriopathien sind klinisch, biochemisch und genetisch heterogene Erkrankungen, die auf Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels basieren.

Diese Erkrankungen verursachende Mutationen können spontan auftreten oder werden vererbt und betreffen sowohl die nDNA, als auch die mtDNA. Der überwiegende Teil der Mitochondriopathien ist genetisch determiniert. Die Hauptursachen dieser Erkrankungen

liegen neben den Störungen im Fettsäureabbau, in Defekten der oxidativen Phosphorylierung. Aus der Dysfunktion des Komplex I resultiert im Wesentlichen ein Mangel an ATP und an  $\text{NAD}^+$ . Die Tatsache, dass durch den Befall verschiedener Organsysteme, v.a. denjenigen mit hohem Energiestoffwechsel (Gehirn, Skelettmuskel, Retina, Myokard), multiple Symptome auftreten, erweist sich als charakteristisch für Mitochondriopathien. In Analogie zu der Variabilität der klinischen Symptome ist die Heterogenität in Bezug auf das Manifestationsalter, die Progressionsgeschwindigkeit und Prognose verständlich (Morgan-Hughes and Hanna, 1999). Es ist bekannt, dass Mutationen sowohl in mitochondrialen als auch in kernkodierten Genen zu Funktionseinschränkungen im Komplex I führen (Loeffen et al., 2000). Erkrankungen, bedingt durch Mutationen in mitochondrial kodierenden Genen, sind beispielsweise MERRF (Myoclonic epilepsy associated with ragged red fibers), MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) KSS (Kears-Sayre Syndrome), CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia), MNGIE (Myoneurogastrointestinal disorder and encephalopathy), LHON (Leber`s hereditary optic neuropathy).

Ebenso lassen sich die Friedreich Ataxie, die Maligne Hypertonie und das Leigh-Syndrom auf Defekte im Komplex I zurückführen. Das Leigh-Syndrom oder „Leigh-like disease“ zählt zu den häufigsten Erkrankungen, die mit einer isolierten Funktionseinschränkung des Komplex I assoziiert sind (Rahman et al., 1996; Morris et al., 1996; Loeffen et al., 2000; Triepels et al., 2001). Das Leigh-Syndrom lässt sich sowohl auf mitochondriale als auch auf nukleäre Mutationen zurückführen, welche jeden Schritt des OXPHOS-Systems (Oxidative Phosphorylierung) beeinträchtigen können.

Die zahlreichen klinischen Syndrome reichen von letalen neonatalen Formen bis hin zu neurodegenerativen Erkrankungen (Schapira, 1998) des Erwachsenenalters, wie z.B. dem Morbus Parkinson (Robinson, 1998) (siehe Tab. 7 und 8 im Anhang). Mit der progressiven Akkumulation von mtDNA-Schäden wird das Altern assoziiert (Wallace, 1992; Brierley et al., 1998), was sich in einem Aktivitätsverlust der Atmungskettenkomplexe I und IV im Alter nachweisen lässt (Stacpoole, 1997).

Dionisi-Vici et al., 1997 beschreiben einen markanten Phänotyp, der sich bei Kleinkindern mit Komplex I-Mangel manifestiert. Es wurde das Erscheinungsbild einer hypertrophen Kardiomyopathie, einer Laktatazidose und einer fatalen progressiven Makroencephalopathie mit progressiver Leukodystrophie geschildert.

### 1.3 Membranproteine

Membranproteine haben eine große funktionelle Relevanz. Sie dienen der Signalübermittlung zwischen extra- und intrazellulärem Milieu. Ferner beteiligen sie sich an der Energieumwandlung und tragen maßgeblich mit dazu bei, dass sowohl die Struktur, als auch das zelluläre Milieu aufrechterhalten bleiben. Durch verschiedene Genomprojekte konnte abgeschätzt werden, dass der Anteil der Membranproteine in Bezug zu allen Proteinen etwa zwischen 25 und 30 % liegt (Wallin, 1998). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass viele genetische Funktionsstörungen der Zellen in direktem Zusammenhang mit funktionsgeminderten Membranproteinen stehen.

Die Strukturaufklärung der Membranproteine birgt im Vergleich zu den löslichen Proteinen deutlich größere Schwierigkeiten, was sich auch an der Anzahl der bisher gelösten Strukturen erkennen lässt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden weniger als 80 unabhängige Membranproteine analysiert (Wiener, 2004) und weniger als 50 integrale Membranproteine mittels Röntgenkristallographie in ihrer Struktur bestimmt (Hunte and Michel, 2002). Im Vergleich dazu sind aber bereits mehr als 30000 Strukturen löslicher Proteine bekannt (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Eine der größten Barrieren für die Strukturanalyse von Membranproteinen ist die Expression und Reinigung einer ausreichenden Menge an Protein, um Kristallisationsversuche durchführen zu können, weil diese sowohl aus natürlichen Ressourcen, als auch durch die Produktion mittels homologer oder heterologer Expressionssysteme häufig nur in geringen Mengen gewonnen werden können (Schertler, 1992). Ein weiteres Problem ist durch die erschwerten Kristallisationsbedingungen bei Membranproteinen gegeben (siehe 1.3.1). Beinahe alle der bisher bestimmten Membranproteinstrukturen sind der Photosynthese oder der Atmungskette zuzuordnen, da deren Proteine in der Regel sehr stabil und vergleichsweise leicht zu reinigen sind und in großen Mengen aus Mitochondrien, Bakterien und Chloroplasten verfügbar sind.

Bei einem Membranprotein lassen sich topologisch drei Domänen abgrenzen. Von denen entsprechen zwei den extramembranösen hydrophilen Bereichen des Proteins auf beiden Seiten der Membran. Hier besteht Kontakt zur wässrigen Phase oder mit den polaren Kopfgruppen der Lipide. Die hydrophobe Domäne durchspannt die Lipiddoppelschichtmembran. Innerhalb der Membran besteht Kontakt zu den Alkylketten der Lipide. Durch die unterschiedlichen Domänen sind solche Proteine nach dem Herauslösen aus der Membran, sowohl in polaren als auch in apolaren Medien, unlöslich. Man behilft sich durch den Einsatz von Detergentien, die den hydrophoben Bereich bedecken und dem Protein auch dort eine hydrophile Oberfläche verleihen (Michel, 1983).

Die Strukturen der Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), sowohl aus Bakterien (Iwata et al., 1995), als auch aus Mitochondrien (Tsukihara et al., 1995; 1996) und der mitochondriale

Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex (Komplex III) (Yu et al., 1997; Hunte, 2001) wurden bereits in ihrer Struktur erfolgreich analysiert. 1999 konnten auch die Strukturen der Succinat: Fumarat Oxidoreduktase von *E. coli* (Iverson et al., 1999, 2002; Yankovskaya et al., 2003), und von *Wolinella succinogenes* (Lancaster et al., 1999, 2001) aufgeklärt werden, die Homologien zu Komplex II aufweisen. Kürzlich gelangen Strukturanalysen des peripheren Anteils der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) (Hinchliffe and Sazanov, 2005), so dass die Aufgabe der Strukturaufklärung des gesamten Komplexes bestehen bleibt.

### 1.3.1 Kristallisation von Membranproteinen, vermittelt durch Antikörperfragmente

Um gut geordnete dreidimensionale Kristalle zu erhalten, müssen die Membranproteine löslich sein - was mit milden Detergentien erreicht wird - und gereinigt als Protein-Detergenz-Komplex vorliegen (Hunte und Michel, 2002). Für die Bildung von 3D Kristallen gibt es bei Membranproteinen zwei verschiedene Möglichkeiten. Zum einen kann versucht werden, dass Protein innerhalb seiner Detergenzmizelle zu kristallisieren. Hier wird das Kristallgitter durch polare Kontakte zwischen den hydrophilen Bereichen des Proteins ausgebildet. In diesem Fall spricht man von Typ II Kristallen. Bei Typ I Kristallen wird versucht zunächst in der Ebene der Membran 2D Kristalle zu formen, die anschließend in einer bestimmten Ordnung gestapelt werden (Ostermeier and Michel, 1997) (Bild 4). Auch Mischformen dieser Kristalltypen sind denkbar. Bei der Kristallisation von Membranproteinen ist der Typ II Kristall vorherrschend.

Um die Wahrscheinlichkeit der Kristallbildung zu erhöhen, wurde der Versuch einer Ko-Kristallisation von Membranproteinen mit Antikörper-Fv-Fragmenten entwickelt, da diese die polare Oberfläche der Membranproteine vergrößern (Ostermeier et al., 1995).

Diese Methode wurde erfolgreich bei der Kristallisation der Cytochrom c Oxidase von *Paracoccus denitrificans* angewendet (Ostermeier et al., 1995; Iwata et al., 1995) und ermöglichte die Strukturbestimmung dieses Proteins (Iwata et al., 1995; Ostermeier et al., 1997). Eben solcher Erfolg war bei der Kristallisation eines Ko-komplexes aus dem Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex von *Saccharomyces cerevisiae* und einem Fv-Fragment zu verzeichnen (Hunte et al., 2000).

Die Kristallisation von Membranproteinen erweist sich wegen ihrer amphipatischen Oberfläche als schwierig. Die Bindung von Fv- oder Fab-Fragmenten vergrößert die hydrophile Oberfläche der integralen Membranproteine, indem sie molekulare Interaktionen fördern, was ebenfalls bedeutet, dass die Gesamtoberfläche für Kristallkontakte zunimmt. Ferner haben sie Einfluss auf das Wachstum geordneter Kristalle (Venturi und Hunte, 2003).

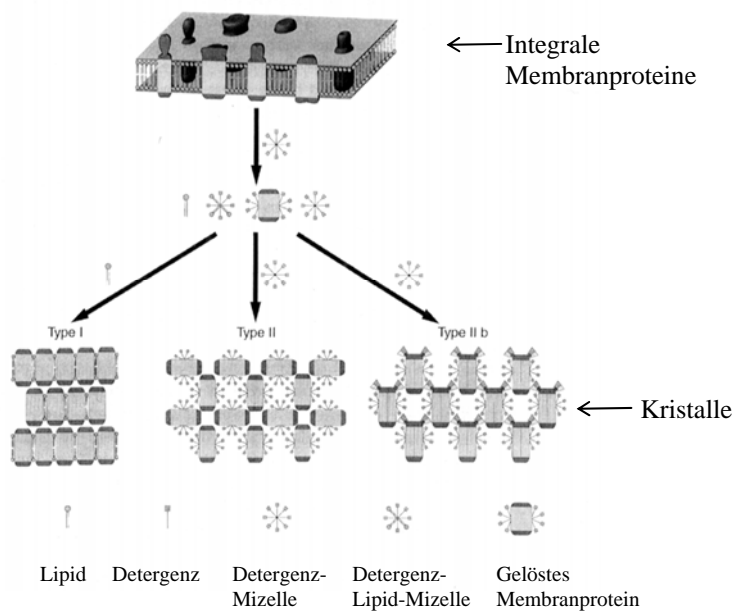


Bild 4: Varianten dreidimensionaler Kristalltypen von Membranproteinen. Typ I besteht aus gestapelten Protein-Detergenz-Lamellen, in denen das Protein zweidimensional kristallisiert ist. Bei Typ II sind die Proteine von einer Detergenzmizelle umgeben und bilden ein 3D-Netzwerk. Eine Modifikation der Typ II Kristalle (Typ IIb) ergeben sich durch die Bindung von Antikörperfragmenten. (entnommen aus „Membrane Protein Purification and Crystallization“, Hunte et al., 2003, S. 145)

#### 1.4 Rekombinante Antikörperfragmente

Antikörperfragmente, als funktionelle Untereinheiten des IgG-Antikörpers (Bild 5) besitzen im Vergleich zu den Vollängenantikörpern vergleichbare Bindungseigenschaften mit gleicher Spezifität. Es ist bekannt, dass die Antigenbindungsaffinität rekombinanter Antikörperfragmente meist etwas geringer ist (Bird und Walker, 1991). Dieses Defizit der geringeren Affinität kann ausgeglichen werden, indem die Fragmente durch eine Reihe molekularbiologischer Techniken modifiziert oder verbessert werden (Proba et al., 1998). Ebenso lässt sich die Stabilität rekombinanter Antikörperfragmente verbessern, was z.B. durch Verwendung alternativer Linker (Alfthan et al., 1995) oder durch Verlegung der CDR`s (complementarity determining regions) in stabilere „framework“-Regionen (Jung und Plückthun, 1997) realisiert werden kann.

Die Herstellung der AK-Fragmente erfolgt z.B. mittels enzymatischer Modifikationen von monoklonalen AK. Nach Behandlung mit Pepsin erhält man bivalente  $F(ab')_2$ -Fragmente (Parham, 1986) und durch Hydrolyse mit Papain monovalente Fab-Fragmente (Porter, 1959) (Bild 5).

Diese Prozeduren sind allerdings sehr kostspielig und oft ineffektiv, denn es werden selten mehr als 25-30% von reinem Fab-Fragment ausgehend von der eingesetzten Proteinmenge erhalten (Venturi und Hunte, 2003). Das monovalente Fv-Fragment, als kleinstes antigenbindendes Derivat eines Antikörpers besteht nur aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette, welche innerhalb jeder dieser Ketten eine Disulfidbrücke aufweisen. Die Länge der variablen Domänen beträgt in der VH-Region 113 Aminosäuren und in der VL-Region 107.



Die Fv`s lassen sich proteolytisch herstellen (Inbar et al., 1972; Hochman et al., 1973), was sich aber als schwierig erweist (Fan et al., 1992). Die Alternative stellt die rekombinante Herstellung mit molekularbiologischen Techniken von Fv`s (Skerra und Plückthun, 1988) oder auch von F(ab`)<sub>2</sub>- und Fab-Fragmenten dar. Bei der Gewinnung der Fv-Fragmente besteht allerdings das Problem, dass sie in niedrigen Konzentrationen sehr instabil sind, so dass die Proteinketten leicht dissoziieren können, zumal die beiden Ketten nur von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zusammengehalten werden (Skerra, 1993). Mit der Dissoziation der Ketten gehen die antigenbindenden Eigenschaften der Fragmente verloren. Die Größe der verschiedenen Antikörperfragmente mag bei der Kristallisation eine Rolle spielen, da unterschiedliche Erfolge bei der Bindung von Fv (ca. 28 kDa) bzw. von Fab (ca. 56 kDa)-Fragmenten erzielt wurden (Hunte and Michel, 2002).

Mittels molekularbiologischer Methoden kann durch Einfügen eines Linkers zwischen den variablen Regionen (VH und VL), d.h. eines flexibles Verbindungspeptid mit einer Länge von 10-30 Aminosäuren, ein Antikörperfragment konstruiert werden, das nur aus einer Kette besteht (ca. 250 Aminosäuren) und eine gute Spezifität und Affinität für sein Epitop aufweist (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988; Winter und Milstein, 1991). Mit einer Vielzahl von anwendbaren Linkern besteht die Möglichkeit die Löslichkeit dieser scFv-Fragmente zu erhöhen (Bird et al., 1988) oder sogar die Affinität des scFv-Fragmentes zu seinem Antigen. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Länge des „Linker“-Peptids die Antigenbindung mit beeinflusst (Colcher et al., 1990). Diese scFv`s sind stabiler als die etwa gleichgroßen Fv-Fragmente. Eine Weiterentwicklung der scFv-Fragmente sind z.B. bivalente oder bispezifische scFv`s (Mallender und Voss, 1994; Schumann, 1996) oder „diabodies“ (Perisic et al., 1994; Adams et al., 1998; Atwell et al., 1999), die ebenfalls rekombinant erzeugt werden. Insgesamt lassen sich Eigenschaften der rekombinanten Antikörperfragmente in Bezug auf ihre Anwendung lenken. Antikörper, deren Fragmente erfolgreich für die Kristallisation mit Membranproteinen eingesetzt wurden, stammen aus Hybridomzelllinien.

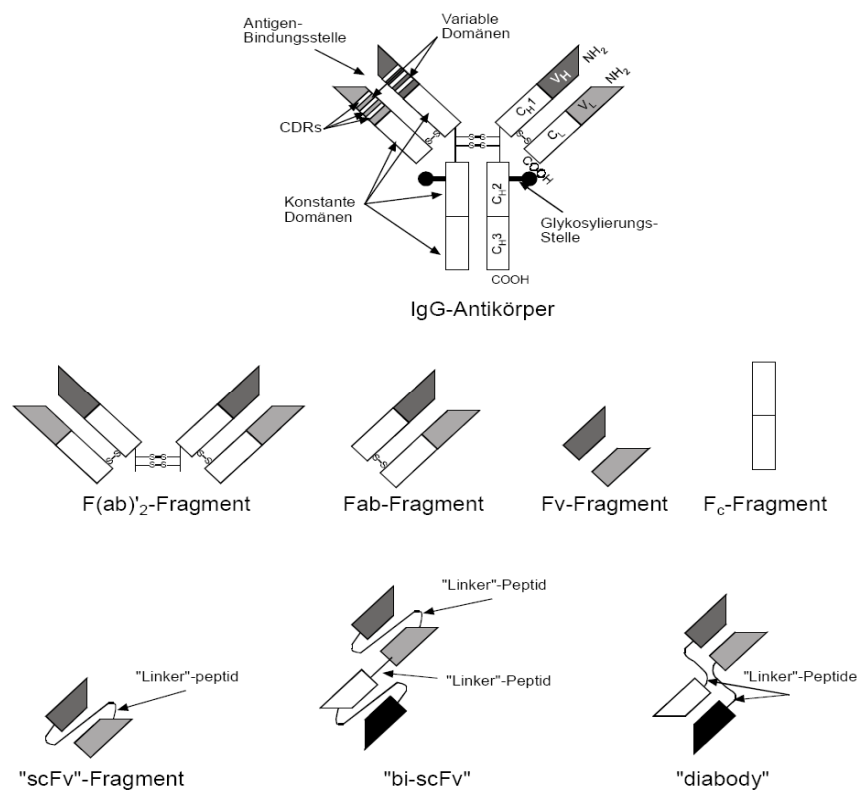


Bild 5: Darstellung eines bivalenten IgG-Antikörper und abgeleitete Antikörperfragmente. -S-S- = Disulfidbrücke,  $V_L$  = variable Region der leichten Kette,  $V_H$  = variable Region der schweren Kette,  $C_{H1-3}$  = konstante Regionen 1-3 der schweren Kette,  $C_L$  = konstante Region der leichten Kette, IgG = Immunglobulin G, Fab = Fragment der Antigenbindungsstelle,  $F(ab)_2$  = Fab`-Dimer, Fv = Fragment der variablen Region, scFv = Einzelketten-Antikörper („single chain fragment of the variable region“), bi-scFv = bivalentes, bispezifisches Einzelkettenkonstrukt, diabody = aus zwei aggregierten Einzelketten bestehendes, bivalentes, bispezifisches Konstrukt, CDR = hypervariable Regionen („complementary determining regions“) (Bild aus Hellwig, 2000).

## 1.5 Expression rekombinanter Antikörper in *E. coli*

*E. coli* als Expressionssystem wird in vielen Labors standardmäßig kultiviert. Ferner sind ausführliche Expressionsprotokolle und Methoden zur genetischen Manipulation weit verbreitet und bekannt. Da allerdings mit einem prokaryontischen System gearbeitet wird, können viele posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen und Aminosäure-Acetylierungen nicht durchgeführt werden. Diese sind für die Funktionen und Eigenschaften vieler Proteine relevant, allerdings nicht für Fv- oder scFv-Fragmente. Die Expression der Fremdproteine erfolgt entweder im Zytoplasma von *E. coli* oder sie werden ins Periplasma sekretiert. Aufgrund des im Zytoplasma vorherrschenden reduzierenden Milieus eignet sich diese Form der Expression (Buchner und Rudolph, 1991) nur

eingeschränkt für Antikörperfragmente, da ihre Stabilität und Funktionalität von der Ausbildung der Disulfidbrücken bestimmt wird. Das reduzierende Milieu im Zytoplasma limitiert die erfolgreiche Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die Ausbeute von funktionsfähigen Antikörperfragmenten (Glockshuber et al., 1992). Im Zytoplasma sind zahlreiche Proteasen enthalten, so dass bei dem Expressionsversuch viele der heterologen Proteine bereits dort zerstört werden.

Für die Expression von Antikörperfragmenten erweist sich der periplasmatische Raum mit seinem oxidierenden Milieu als geeigneter. Neben dem geringeren quantitativen Ausmaß an Proteasen sind im Periplasma auch weniger wirtseigene Proteine zu finden, wodurch die anschließende Reinigung der Fremdproteine erleichtert wird (Lindner et al., 1992). Die Sekretion der Fremdproteine wird von Signalpeptiden wie z.B. OmpA oder PhoA gesteuert. Bei Fv-Fragmenten werden die zugehörigen Ketten (VH, VL) co-exprimiert und ins Periplasma von *E. coli* mittels Signalsteuerung (PhoA, OmpA) co-sekretiert. Die korrekte Disulfidformation und Kettenassoziation erfolgt anschließend im Periplasma. Die Cysteine in der Aminosäuresequenz von VH und VL haben entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute bei rekombinanter Expression von Antikörperfragmenten in *E. coli* (Ward et al., 1993) und sind ein wichtiger Indikator, hinsichtlich ihrer Stabilität, während die Disulfidbrücke für die korrekte Faltung und die Stabilität der Fv-Fragmente unverzichtbar ist.

Die bakterielle Expression von Fv-Fragmenten lässt sich nur empirisch ermitteln. Durch Fusion mit bakteriellen Proteinen, z.B. Thioredoxin aus *E. coli* (LaVallie et al., 1993), oder durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren im Bereich der CDR`s oder „frameworks“ des Proteinproduktes kann Einfluss auf die Löslichkeit und Stabilität der Antikörperfragmente genommen werden, womit letztlich eine Steigerung des Expressionsniveaus ermöglicht wird (Knappik und Plückthun, 1995; Kipriyanov et al., 1997; Forsberg et al., 1997). Weitere Ansatzpunkte zur Verbesserung der zytoplasmatischen und periplasmatischen Expression liegen in der Wahl des Bakterienstammes, der sich ebenso wie die Kultivierungs- und Induktionsbedingungen variieren lässt.

## 1.6 Bedeutung der Affinitätstags an VH und VL

Eine verbreitete Methode, um ein Protein selektiv aufzureinigen ist die Affinitätschromatographie, die bei vielen Enzymen durch immobilisierte Substratanaloga vollzogen wird. Ist die Affinität zu den Substratanaloga zu niedrig oder sind hochspezifische Säulenmaterialien nicht verfügbar, werden Affinitätstags eingesetzt.

### 1.6.1 Das Strep-Tag-Affinitätspeptid, C-terminal an VH

Das Affinitätspeptid „Strep-Tag“ ist eine aus neun Aminosäuren (AWRHPQFGG) bestehende kurze Peptidsequenz, die an Streptavidin bindet und von dem natürlichen Liganden Biotin bzw. deren Analoga (Desthiobiotin, Imminobiotin, Fettsäure- oder vorzugsweise Diaminbiotin (cf Green,1975)) im Überschuss selektiv verdrängt werden kann.

Das Strep-Tag wurde mittels Selektion einer genetischen Fusionspeptidbibliothek, mit der Fähigkeit Streptavidin in spezifischer und reversibler Art binden zu können, erstellt (Schmidt und Skerra, 1993). Ein Strep-Tag am C-Terminus von bakteriell produzierten Proteinen ermöglicht nicht nur eine leichte Detektion durch Gebrauch eines Streptavidin-Konjugates, sondern auch ihre Einschnitt-Affinitätsreinigung an Säulen mit immobilisierten Streptavidin (Schmidt und Skerra, 1994), sowie eine schonende Isolierung von Fv's. Die erfolgreiche Anwendung dieser Methode wurde für verschiedene rekombinante Proteine demonstriert (Schmidt und Skerra, 1993; Ostermeier et al., 1995). Ebenso konnte von Schmidt und Skerra 1993 gezeigt werden, dass bakteriell produzierte Fv-Fragmente, die das Strep-Tag an ihrer schweren Kette haben auch das passende Antigen binden und als intakter Fv-Antigen-Komplex gereinigt werden können, wenn eine hohe Affinität zum Antigen gewährleistet ist. Diese Strategie erwies sich v.a. für die schnelle Isolation von Membranproteinen als effektiv (Kleymann et al., 1995).

### 1.6.2 Myc-Tag, C-terminal an VL

Das c-myc Genprodukt, ein 62kDa Proto-Onkogen (p62c-myc) ist vorrangig im Zellkern lokalisiert und wird von hämatologischen Tumoren exprimiert. „p62“ ist als diagnostischer Tumormarker bekannt (Fuchs et al., 1997). Der Antikörper 9E10 erkennt diese Peptidsequenz als antigene Determinante, wodurch eine Detektion und Reinigung möglich ist und dient damit als umfassendes immunochemisches Reagenz unter anderem in der Zellbiologie. 9E10, kloniert aus Hybridomzelllinien, ist ein IgG/ $\kappa$  monoklonaler Antikörper, dessen Paratop ursprünglich gegen ein synthetisches Peptid-Immunogen gerichtet war und aus menschlichen c-myc Proto-Oncoprotein hergeleitet war (Evan et al., 1985). Daher wurde der Antikörper 9E10 in der Krebsforschung eingesetzt, da auf diesem Weg mittels Immunhistochemie die Verteilung der c-myc Oncogenprodukte detektiert werden konnte.

Das myc-Tag kann mit dem Carboxylende der leichten Kette von Antikörpern bzw. ihren Fragmenten fusioniert sein (Munro and Pelham, 1986). Die Aminosäuresequenz des kurzen Affinitätstags lautet: EQKLISEEDLN (Hoogenboom et al., 1991), oder EEQKLISEEDL

(Fuchs et al., 1997), welche für die Detektion und / oder Reinigung von rekombinanten Proteinen von Bedeutung sind (Tanaka et al., 1996).



## 1.7 Zielsetzung

Der Mechanismus der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) ist aufgrund fehlender Strukturdaten noch weitgehend unverstanden. Die bisher bekannte Topologie des Komplex I beruht auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Einzelpartikeln und 2D-Kristallen. Es fehlt nach wie vor an Kenntnissen über die genaue Lage der Untereinheiten. Für die Aufklärung des Mechanismus von Elektronen- und Protonentransport bedarf es der hoch aufgelösten Struktur als Grundlage, was wiederum die Kristallisation des Komplex I erforderlich macht. Diese Erkenntnis ist auch hinsichtlich der physiologischen Bedeutung von Komplex I und dem Wissen über eine Vielzahl von Krankheiten, die unmittelbar im Zusammenhang mit Defekten dieses Enzyms stehen (Robinson, 1998; Schapira, 1998) entscheidend.

Aus vorangehenden Arbeiten (Ostermeier et al., 1995; Hunte et al., 2000) ist bekannt, dass Membranproteine mit Hilfe von Antikörperfragmenten kristallisiert werden können. Daher galt es als Ziel dieser Arbeit rekombinante Antikörperfragmente zu synthetisieren, welche gegen dieses Membranprotein gerichtet sind.

Dazu sollen ausgehend von der mRNA die Gene für die variable Region der schweren und leichten Kette kloniert und in einem *E.coli*-Stamm exprimiert werden. Bei ausreichendem Expressionsniveau sollen Bindungsversuche der Fv-Fragmente gegen den Komplex I unternommen werden. Ziel dieser Bindungsversuche ist die Herstellung eines Ko-Komplexes aus dem Fv-Fragment und der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase. Die Kristallisation ist ein empirischer Prozess, der das Testen vieler verschiedener Bedingungen beinhaltet. Mit der Entstehung von Kristallen besteht die Möglichkeit mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse zum Verständnis über den Wirkmechanismus und die Funktion von Komplex I der Atmungskette beizutragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Methoden - molekulargenetisch-

#### 2.1.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Aufzucht von *Escherichia coli* erfolgte bei 37°C in LB-Medium für 14-16 Stunden. Um feste Nährböden zu erhalten wurden dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugegeben. Nach Bedarf wurde der Nährboden nach dem Autoklavieren zur Selektion mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzt. Kulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert. Gefrierkulturen in doppelt konzentriertem TY-Medium mit 20 % Glycerin wurden bei -80°C gelagert.

#### 2.1.1.2 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen und Transformation

Die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde wie in Current Protocols (Ausubel et al., 2000) angegeben durchgeführt. Die Herstellung der Zellen, die für die Hitzeschock-Transformation Verwendung fanden, folgte dem Hanahan-Protokoll (1983) sowie Angaben aus Publikationen von X. Tang und Y. Nakata (1994). Die hergestellten kompetenten Zellen hatten eine Transformationseffizienz zwischen  $5 \times 10^5$  und  $10^9$  Kolonien/ µg Plasmid DNA. Bei der Elektrottransformation mit Hilfe des *E. coli* Pulser (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde nach der Methode der Current Protocols (Ausubel et al., 2000) verfahren.

#### 2.1.1.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA aus kleinen Kulturvolumina (1,5-3,0 ml) diente die von Zhou et al., 1990 beschriebene TENS Plasmid Miniprep-Methode.

Die DNA wurde mit dem Ziel der anschließenden Sequenzierung mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nachgereinigt. Zusätzlich zu der von Zhou et al., 1990 beschriebenen Methode wurde der E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder Machery-Nagel (Düren) zur Präparation von Plasmid-DNA verwendet.



## 2.1.2 Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

### 2.1.2.1 Vorbereitung der mRNA

Die mRNA der Hybridomzelllinie wurde präpariert und Einzelstrang cDNA synthetisiert. Die Primer weisen singuläre Restriktionschnittstellen (SstI, XhoI leichte Kette; PstI, BstEII schwere Kette) zur Klonierung in das Expressionsplasmid in pASK68 auf.

Alle Lösungen und Puffer wurden zur Inaktivierung der RNasen, wenn möglich nach Zusatz von 0,1 % DEPC autoklaviert. Die Geräte und Chemikalien für die RNA-Präparation wurden gesondert aufbewahrt.

Die mRNA musste für die weitere Verwendung noch aufbereitet werden. Nach dem Waschschrift wird die mRNA in einem zuvor bestimmtem Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, so dass eine Konzentration von 5 ng/μl vorlag.

Dabei wurde berücksichtigt, dass bei der Fällung der mRNA etwa 50% Verlust eintreten und damit die Konzentration der mRNA vor der Fällung nicht mehr der photometrisch bestimmten entspricht.

Bei der RT-PCR wurde nach den Anweisungen des Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche, Penzberg [Germany]) gearbeitet.

Für die Polymerasereaktion wurden die T4-DNA Polymerase und T4-DNA Ligase in entsprechender Reihenfolge in den Synthese-Puffer mit den vier d-NTP gegeben, wobei dies auf Eis erfolgte. Diese Reihenfolge ist von Bedeutung, da die Polymerase über eine ausgeprägte Exonukleaseaktivität verfügt, die bei niedrigen Konzentrationen oder Fehlen von dNTP zum Tragen kommt (Zickermann, 1996; S. 17). Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 90-120 min inkubiert.

### 2.1.2.2 PCR und Klonieren von PCR-Produkten

Mit den Primern (2.1.2.3) im Mix wurde jetzt die PCR gestartet.

Ein 10 μl Reaktionsansatz enthielt 50 ng DNA, weiterhin je 6,4 pmol der Oligonukleotide und 1 μl des mitgelieferten Puffers der hitzestabilen DNA-Polymerase. Die Endkonzentration der Nukleotide betrug dabei je 200 μM. Die verwendeten Polymerasen waren: Taq DNA Polymerase von Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) und PfuTurbo<sup>TM</sup> DNA Polymerase von Stratagene (Heidelberg). Um das Risiko der Fehlhybridisierung der Oligonukleotide und der Primerdimerbildung so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Einleitung der Reaktion mit einem sog. „hot start“, wodurch die Polymeraseaktivität während der Reaktionsvorbereitung inhibiert wird.

### 2.1.2.3 Primer

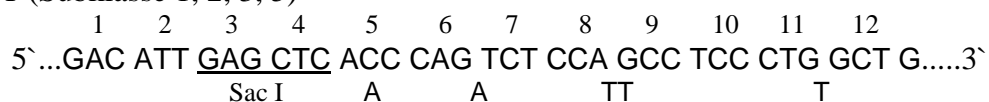
Das Design der Primer erfolgt nach der Wu-Kabat Antikörperbibliothek. In dieser Arbeit wurden auf im MPI für Biophysik, Frankfurt entwickelte Primer zurückgegriffen. Über die in den Primern kodierte Schnittstellen können diese Sequenzen im Weiteren kloniert werden.

Die eingesetzten Primer unterscheiden sich je nach Einsatz für die schwere und die leichte Kette. Die Sequenzen der Schnittstellen sind unterstrichen.

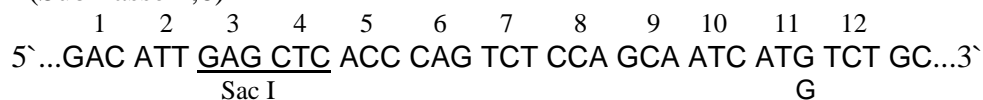
Die Primer für die  $\kappa$ -Ketten von VL lauten:

#### Forward-Primer

VKC1T (Subklasse 1, 2, 3, 5)

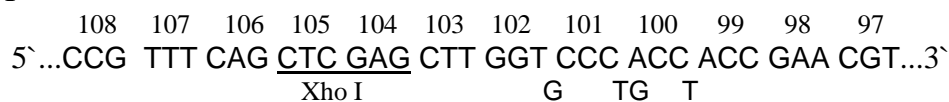


VKC2T (Subklasse 4,6)



#### Backward-Primer

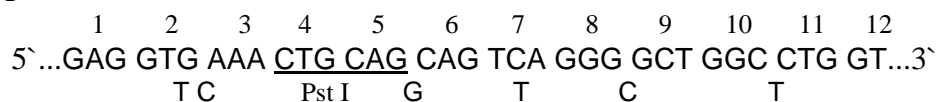
VKR1T



Primer für VH:

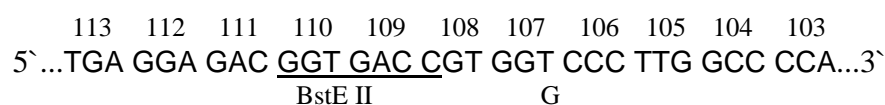
#### Forward-Primer

VHC1T



#### Backward-Primer

VHR1T



Die über den Basentriplets angegebenen Zahlen entsprechen der Aminosäuresequenz der Antikörper, an der der Primer bindet (Kabat et al., 1991).

#### 2.1.2.4 Verdau von Plasmid-Template-DNA

Zur Entfernung des Templates nach vorangegangener Polymerasekettenreaktion, wurde ein 10 µl Ansatz mit dem entsprechenden Reaktionspuffer und 1 µl DpnI-Enzym versetzt, abzentrifugiert und bei 37°C für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

#### 2.1.2.5 Phosphorylierung des PCR-Produktes

Für die Ligasereaktion ist eine Phosphorylierung am 5'-Ende des Oligonukleotides essentiell, welche mit der T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) eingeführt wurde. Die Phosphorylierung erfolgte nach dem Protokoll von Ausubel et al., 2000.

#### 2.1.2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Vektoren, in die DNA-Fragmente kloniert werden sollen, wurden entsprechend den Herstellerangaben (Boehringer Mannheim, Mannheim) mit CIP (calf intestine alkaline phosphatase) oder SAP (shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert mit dem Ziel eine Selbstligation zu verhindern. SAP ist hitzedeaktivierbar. CIP wurde mittels Phenol/Chloroform Extraktion aus dem Ansatz entfernt.

#### 2.1.2.7 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase sowie der mitgelieferte Puffer (Gibco BRL Life Technologies) verwendet.

Die Konzentration von Vektor und dem entsprechend einzusetzenden Fragment wurde nach Legerski und Robberson (Legerski und Robberson, 1985) eingestellt.

Der Ligationsansatz wird für ca. 16 h bei 14°C inkubiert.

#### 2.1.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung der DNA nach Standardmethoden wurden die Proben auf ein TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Gel (analytisches Gel) aufgetragen.

Bei den präparativen Gelen handelt es sich um 1 % bzw. 1,5 % -ige Agarosegele ((TAE-Puffer mit Zusatz UV-safe TAE, MWG-Biotech, Ebersberg) versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid). Die verwendete Agarosekonzentration richtet sich nach der Länge der zu trennenden DNA-Fragmente. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei Spannungen von 60 V bzw. 90 V für den Zeitraum von etwa einer Stunde durchgeführt. Nach dieser Laufzeit wurden die DNA-Banden durch den im Gel befindlichen Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid mittels UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationsanlage fotografiert. Die Größenbestimmung der elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente wurde durch einen Vergleich der Laufstrecken der zu analysierenden Banden mit denen der Markerfragmente der DNA-Größenmarker "1kb Ladder" und 100 bp Ladder plus" (MBI Fermentas, St. Leo-Rot) realisiert. Für die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde das DNA-Purification Kit „Easy Pure“ der Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf verwendet. Hierbei wurde die DNA-Bande nach dem Herausschneiden mit einem Skalpell unter UV-Belichtung aus dem Gel gelöst und anschließend gemäß der Herstellerangabe gereinigt. Das Sediment wurde in 10 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels Hoefer®DyNA Quant®200 Fluorometer (Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) bestimmt.

#### 2.1.4 Ethanol-Präzipitation

Um die DNA-Proben zu konzentrieren, wurde eine Fällungsreaktion durchgeführt. Der zu konzentrierenden DNA wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat sowie 2,5 Volumina abs. Ethanol (-20°C) zugesetzt, gemischt und darauf folgend bei -20°C für wenigstens 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min zentrifugiert, was die Sedimentation der DNA zur Folge hatte. Das Präzipitat wurde, nachdem der Überstand abpipettiert worden war, in einer bestimmten Menge an 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, anschließend für etwa 15 min bei 37°C im Brutschrank getrocknet und dann in einen adäquaten Volumen von TE-Puffer oder Aqua tridest. aufgenommen.

#### 2.1.5 Sequenzierung

Nach der Trennung auf einem Agarosegel und Aufreinigung der DNA mittels dem DyeEX™ Spin Kit (Qiagen, Hilden), kann die doppelsträngige DNA (200-500 ng) für die Sequenzanalyse als *template* eingesetzt werden, die mit einem spezifischen Primer

hybridisiert. Die Sequenzierungsreaktionen erfolgten mit dem ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer, Weiterstadt).

Die Ansätze wurden mit dem ABI Prism Automated Sequencer des Typs ABI 310 (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) unter Verwendung der Software „Sequence Navigator“ analysiert.

### 2.1.6 Restriktion der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die zur Inkubation der DNA mit Restriktionsendonukleasen verwendeten Puffer und Temperaturen wurden nach Angaben des Herstellers „New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus“ verwendet. Damit wurde die Identifikation rekombinierter Plasmide und die Gewinnung definierter DNA-Fragmente angestrebt.

Folgende Fragmente konnten erwartet werden:

VH	ca. 330 bp	Pst I und BstE II geschnitten
VL	ca. 300 bp	Sst I und Xho I geschnitten
<i>linker</i>	ca. 140 bp	BstE II und Sst I geschnitten
VH und VL	ca. 770 bp	Pst I und Xho I geschnitten

### 2.1.7 Punktmutagenese

Die Punktmutation wurde über PCR mittels des „QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) eingeführt. Die Primer wurden von MWG BIOTECH bezogen.

Bei gegebener Ausgangssequenz:

```
5`...GGACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAGAG...3`
3`...CCTGTCTAAAGAGTCAGTTCTAGTCGTCTC...5`
```

lautete der Forward-Primer :

```
5`...GGACAGATTTCTCAGTCAAGATCAGCAGAG...3`
```

und der Backward-Primer:

```
5`...CTCTGCTGATCTTGACTGAGAAATCTGTCC...3`
```

Tyrosin	:ACA → Serin	:TCA
Leucin	:CTC → Valin	:GTC

## 2.2 Methoden - proteinchemisch -

### 2.2.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wurde ein Trenngel (pH 8,8) mit darüber liegendem Sammelgel (pH 6,8) mit Geltaschen, in die pro Spur ca. 10 µg Protein aufgetragen wurden, angefertigt. Die Durchführung ist an die Beschreibung von Schägger und von Jagow (1987), sowie Schägger (1994) angelehnt.

Anhand dieser Methode lässt sich das Expressionsniveau des Fv-Fragmentes abschätzen. Die leichte und schwere Kette laufen je bei einer Molekularmasse von 14 kDa. Bei Expressionsraten größer als 0,2 mg/l Kultur erscheint eine sichtbare Bande. Unterhalb der angegebenen Konzentration besteht die Möglichkeit, dass die interessierenden Banden nur sehr schwach zu erkennen sind bzw. die Auftrennung in die schwere und leichte Kette nicht ganz eindeutig ist (Ostermeier, 1995, S.64). In diesem Fall bedarf es der Anwendung von Immunoblots (s. 2.2.2.), mit denen sich eine in Frage stehende Expression nachweisen lässt. Allerdings eignen sich Klone, deren Fv-Bande nicht oder nur unzureichend im SDS-Gel erscheint, nicht für eine Ko-Kristallisation, da zu wenig Material vorhanden ist.

### 2.2.2 Western-Blot

Im Immunoblot werden im *semidry*-Verfahren die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Matrix aus Nitrocellulose bzw. Immobilon P Membranen übertragen, die mit dem Gel beim Blotten in Kontakt gebracht werden. Es wurde nach der von Schägger, 1994 beschriebenen Methode vorgegangen. Die Filterpapiere, Whatman M3 Papiere, und die Membran der richtigen Größe wurden einige Minuten in Puffer getränkt, um den elektrischen Kontakt zu sichern. Verwendet wurden Polyvinylidendifluorid-Membranen (Immobilon™ -P, Millipore, Schwalbach).

Auf die Kathode wurden vier in Kathodenpuffer (300 mM AC, 30 mM Tris, pH = 9,2) getränkte Filterpapiere, anschließend das Gel und die Membran gelegt. Darauf folgten dann die vier weiteren in Anodenpuffer (300 mM Tris, 100 mM Tricin, pH = 8,7) getränkten Filterpapiere, bevor die Anode das System vervollständigte. Der Transfer dauerte 120-150 min, bei 200 mA und 20 V.

Mit dem Western-Blot ließ sich die Anwesenheit der VH und VL durch immunologische Detektion des spezifischen Affinitätstags nachweisen.

## 2.2.3 Immunologische Detektion

### 2.2.3.1 ECL-Immunoblot

Die leichte Kette der exprimierten Fv-Fragmente wurde durch den ECL-Immunoblot (Amersham Biosciences, Braunschweig) über dem c-myc-Tag nachgewiesen. Dazu wurden 2D-Gele (SDS) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert. Die Entfärbung nach dem Proteintransfer erfolgte für 3 min in Methanol. Nach dem halbstündigen Blocken in TX PBS<sub>2</sub> (0,4%), um alle unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen, wurde der Blot insgesamt 20 min in TX PBS<sub>1</sub> (0,1%) gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde der erste Antikörper, 9E10 als verdünnte Lösung auf die Membran gegeben und für etwa 15 h inkubiert. Nachdem die Membran 20 min mit TX PBS<sub>1</sub>(0,1%) gewaschen worden war, erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit dem Antikörper,  $\alpha$ MIgG [1:15000 in Waschpuffer; Antimaus IgG mAB Peroxidasekonjugat (Sigma)].

Die Inkubationen fanden jeweils bei Raumtemperatur auf dem Schüttler statt.

Anschließend wurde die Membran erneut für 20 min in TX PBS<sub>1</sub> gewaschen und nun zur Detektion der VL verwendet. Dazu wurde die Membran getrocknet und mit den Chemoluminolreagentien ECL1 und ECL2 für 1x 5 und 1 x 1 min detektiert. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Unmittelbar nach Oxidation befindet sich das Luminol in angeregtem Zustand, wobei es beim Zurückkehren in seinen Grundzustand Licht emittiert. Zum Nachweis dieser Lichtemission wurde die Membran für 10 s und 2 min auf einem Röntgenfilm exponiert.

### 2.2.3.2 Strep-Tag Nachweis

Zur Detektion der schweren Kette wurde ein Streptavidin-AP-Konjugat (Amersham, 1:1000) verwendet.

Das Immobilon wurde nach dem Blotten für 5 min gefärbt (0,02 % SBG, 2,5 % Methanol, 10 % Essigsäure) und anschließend ca. 10 min entfärbt (25 % MeOH, 10 % Essigsäure). Der getrocknete Blot wurde zurechtgeschnitten, dann für 3 min in Methanol und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O gespült. Um unspezifische Bindestellen zu sättigen erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur in 25 ml TPBS (PBS mit 0,05% Tween 20), dem 25  $\mu$ l Avidin (2 mg/ml, aus Hühnereiweiß, Fluka, München) hinzugefügt wurden, auf dem Schüttler für etwa eine Stunde. Nach der Inkubationszeit wurde der Blot ca. 20 min mit TPBS gespült und dann eine weitere Stunde auf dem Schüttler nach Zusatz eines Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugates (Strep-AP, Amersham life science RPN 1234) in TPBS (1/1000) inkubiert.

Nach Entfernung unspezifisch gebundener Konjugate in einem Waschvorgang (3 x 5 min) mit TPBS, konnte die alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Für die Farbreaktion wurden BCIP/NBT Tabletten (Alkaline Phosphatase Substrat → Sigma-Aldrich, Steinheim, Fast™ 5 Bromo- 4 Chloro- 3- Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Tablets) verwendet. Die Reaktion wurde durch Abgießen der Lösung und einem Waschschrift mit Aqua dest. gestoppt.

#### 2.2.4 Analytische und präparative Expression der Fv-Fragmente

Die Fv-Fragmente, die in das Plasmid pASK68 kloniert wurden, konnten in JM83, einem *E.coli*-Stamm zur Expression gebracht werden. Bei diesen Versuchen wurde zunächst eine Testexpression mit Kulturvolumina von 3 x 60 ml eingesetzt, während anschließend bei der präparativen Expression je nach erwarteter Ausbeute Volumina von 6-12 l verwendet wurden.

Bei der Testexpression wurden von ausgewählten Klonen, zunächst in 1,5 ml LB-Amp/Strep Übernachtskulturen angelegt, die bei 37°C inkubierten. Die Hauptkulturen (60 ml LB-Amp) wurden mit 1,2 ml (1:50) Übernachtskultur angeimpft, wobei für einen Klon zwei Hauptkulturen angesetzt wurden. Die Hauptkulturen wurden bei 23°C mit 220 rpm geschüttelt. Wenn eine OD 550 von 0,5 erreicht war (Messung gegen Medium, 1:1 verdünnt), wurden die Hauptkulturen mit Ausnahme der Negativkontrolle mit jeweils 1 mM IPTG (1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid) induziert. Mit dem Ziel eine Zeitreihe zu erstellen wurden nach 90 min von den 60 ml der Hauptkultur zunächst 20 ml geerntet und nach 3 h dann der Rest. Die Kulturen wurden zunächst zentrifugiert (12 min, 4°C, 4000g - Cryofuge 8000-), anschließend das Sediment in kaltem Periplasmaaufschlusspuffer (0,5 M Saccharose, 100 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0) im Verhältnis 1/100 Kulturvolumen resuspendiert und dann für etwa 30 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Procedere erfolgte eine weitere Zentrifugation (45min, 4°C, 5000g -Sorvall SS34-), nach welcher das Periplasma mit den gewonnenen Fv-Fragmenten im Überstand bei -80°C in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren werden konnte und damit lagerfähig wurde.

Bei den Hauptkulturen wurden Vorkulturen in 1,5 ml LB Amp/Strep für etwa 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden 60 ml einer LB Amp/Strep Lösung angeimpft und über Nacht bei 37 °C bei 220 rpm inkubiert. Die 6 x 2 l LB-Amp Hauptkulturen wurden im Verhältnis 1:50 mit entsprechenden Vorkulturen angeimpft und inkubierten bei 23°C mit ca. 120 rpm im Schüttler bis die OD<sub>550</sub> 0,5 betrug. Die Induktion und die Ernte verliefen wie oben bereits beschrieben nach 90 min und 180 min.



#### 2.2.4.1 Reinigung der Fv-Fragmente

Zur Reinigung der Fv-Fragmente wurde die Strep-Tag-Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose angewandt (Schmidt und Skerra, 1993).

Das Periplasma wurde zunächst auf Eis für 30 min mit 400 µg/l Kulturvolumen Avidin (Fluka) inkubiert mit dem Ziel möglicherweise vorkommendes Biotin oder auch biotinylierte Proteine zu binden. Nach anschließender Zentrifugation des Periplasmas (35000 x g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand steril filtriert und das klare Filtrat auf die 5 ml core-Streptavidin-Sepharose Säule aufgetragen, die zuvor mit 10 Säulenvolumina Puffer (50 mM Tris/ HCl pH 8,0) äquilibriert wurde.

Nicht gebundene Proteine wurden eliminiert, indem nach diesem Durchgang ein weiterer Waschschritt mit 5 Säulenvolumina durchgeführt wurde. Dann wurde der Elutionspuffer (2,5 mM Desthiobiotin) an die Säule geschlossen und einzelne Fraktionen von 500 µl aufgefangen. Die Aufreinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Es wurden jeweils 16 Fraktionen aufgefangen, die dann anschließend im Vergleich zu der Urprobe, sprich dem unbehandelten Periplasma auf ein SDS-Gel 10 bzw. 16 % aufgetragen wurden. Nach Fixierung, Färbung und Entfärbung können dann die Fraktionen der aufgereinigten Fv-Fragmente ausgewählt werden, die zunächst gepoolt und mittels Ultrafiltration (Vivaspin 10000, 4270 rpm, 4°C) aufkonzentriert wurden.

Nach der Reinigung der Fv-Fragmente wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (2.2.5), um die Konzentration des gewonnenen Fv Fragmente von bestimmen zu können.

Die Bindungseigenschaften der Fv-Fragmente an den Komplex I wurden mittels Gelfiltration (2.2.4.2) geprüft.

#### 2.2.4.2 Bindungsversuche der Fv-Fragmente an Komplex I mit Hilfe der FPLC-Gelfiltration

Zur Kristallisation wurde ein homogener, stöchiometrischer 1:1 Komplex angestrebt. Durch die Gelfiltration besteht die Möglichkeit bei ausreichend starker Bindung zwischen dem Komplex I und den Fv-Fragmenten, die nicht gebundenen Fv-Fragmente zu eliminieren.

Die Versuche wurden an der Biosys 2000 Protein-Reinigungs-Workstation<sup>®</sup>, Beckman Instruments GmbH (München) durchgeführt.

Der gereinigte Komplex I (nach Kashani-Poor et al., 2001(a)) wurde mit Überschuss (1,5-fach) an gereinigten Fv-Fragmenten (Volumen je nach Konzentration) von monoklonalen Antikörpern versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Dazu wurden 7 mg in 250 µl des

Komplex I mit FPLC-Puffer auf 3 ml verdünnt. Unter sanftem Schütteln wurden 420 µl Fv-Fragmente zugegeben. Anschließend wurde steril filtriert (Ultrafree®-MC Low Binding Durapore® Membrane, Sigma). Das Gemisch wurde auf die TSK Säule (TSKgel G4000SW, Biosys 2000, 21,5 mm x 60 cm Säule) aufgetragen.

Als Laufpuffer wurden 25 mM Na-MOPS, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl und 0,025 % LM, pH 7,2 verwendet. Die Flussrate betrug 2 ml/min.

Die Säule gewährleistete entsprechend schnelle FPLC-Läufe (hohe Flussrate), welche die Wahrscheinlichkeit einer Dissoziation des Ko-Komplexes reduzierte. Die Detektion erfolgte bei 280 nm und 415 nm.

### 2.2.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Nach Lowry et al., 1951 mit einer Modifikation von Helenius und Simons, 1972 und Markwell et al., 1978 wurde die Proteinbestimmung durchgeführt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin in den Konzentrationen von 0,1 bis 0,2 mg/ml. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 578 nm.

### 2.2.6 Aktivitätstest (HAR)

Durch Messung der Elektronentransportrate von NADH auf HAR (Endkonzentration auf 2 mM) kann die spezifische Enzymaktivität des gereinigten Komplex I bestimmt werden. Nach der Reinigung des Komplex I durch die Gelfiltration sollte die Enzymaktivität des eingesetzten Membranproteins bestimmt werden. Die Messung wurde in einer Küvette mit der Schichtdicke 1 cm durchgeführt, in die 1 ml Puffer (20 mM Hepes, pH 8,0, 250 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 2 mM NaN<sub>3</sub>), 2 µl NADH (200µM) und 20 µl HAR (2 mM) gegeben wurden und bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Komplex I (+Fv) zugesetzt und die Extinktionsänderung bei 340 nm und 400 nm gemessen.

### 2.2.7 Kristallisationsbedingungen für Komplex I YL mit Fv (Y34C10)

Alle Lösungen enthielten 1,5 mM NaAzid, 50 mM NaCl, 100 mM Puffer, 0,02 % LM (Glycon) (n-dodecyl  $\beta$ -D-maltosid) (Detergent).

WELL	PEG 4000 (%)	Puffer
A1	5	NaCitrat, pH 5,6
A2	6	NaCitrat, pH 5,6
A3	7	NaCitrat, pH 5,6
A4	8	NaCitrat, pH 5,6
A5	4	ADA, pH 6,5
A6	5	ADA, pH 6,5
B1	6	ADA, pH 6,5
B2	5	HEPES, pH 7,5
B3	6	HEPES, pH 7,5
B4	6	TrisCl, pH 8,0
B5	7	TrisCl, pH 8,0
B6	6	TrisCl, pH 8,5
C1	7	TrisCl, pH 8,5
C2	8	TrisCl, pH 8,5
	Ammoniumsulfatlsgn. aus GRID screen + 0,02% LM	
C3	1,2	pH 5,0
C4	1,2	pH 6,0
C5	1,2	pH 7,0
C6	1,2	pH 8,0
D1	1,2	pH 9,0
D2	1,6	pH 5,0
D3	1,6	pH 6,0
D4	1,6	pH 7,0
D5	1,6	pH 8,0
D6	1,6	pH 9,0

Tabelle 3: Kristallisationsplatte mit variierten Bedingungen / Well

#### 2.2.7.1 Methode des hängenden Tropfens („hanging drop“)

Eine gängige Methode zur Erzeugung von Proteinkristallen ist die „Methode des hängenden Tropfens“.

Es wurden 24er-Zellkulturplatten Linbro Nr.76-033-05 (Flow Laboratories, Hampton Resarch) verwendet. Zunächst wurden die Ränder mit einem Fettring (Basilone-Paste, BAYER) versehen, um den Napf gasdicht zu verschließen. Die Nöpfchen selbst wurden mit 1 ml der Fällungs-/Reservoirlösung gefüllt. Als Fällungslösungen wurden Ammoniumsulfat und Polyethylenglycole verschiedener molekularer Massen verwendet. Vorversuche haben gezeigt, dass die günstigsten Kristallisationsbedingungen bei pH-Werten um 5-9 liegen, wie es bei diesen Versuchen auch Anwendung fand, was aus der Tabelle 3 ersichtlich wird.

Pro Well wurden pro Tropfen 4 µl der Proteinlösung und 4 µl der Mutterlauge eingesetzt. Die Proteinlösung wird auf das Deckgläschen in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Etwa in Anordnung eines gleichseitigen Dreiecks wurden an den Eckpunkten die Lösungen im Verhältnis 1:1, 1:2 und 2:1 aufgetragen. Die Reservoirlösung enthielt eine höhere Fällungsmittelkonzentration als der Tropfen mit dem Protein.

Die fertigen Platten wurden bei konstanter Temperatur (4°C oder 18°C) in Ruhe gelagert und nach drei Tagen erstmals mikroskopisch bewertet.

## 2.3 Materialien

### Verwendete Medien und Lösungen

Medien für *Escherichia coli*:

LB-Medium : 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, pH 7,5  
Zur Transformantenselektion war zusätzlich Ampicillin enthalten (50mg/l)  
LB-Agar enthält zuzüglich zum Medium 1,5% Agar

SOB-Medium : 20 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,18 g KCl, Aqua tridest.ad 1000 ml, 10 ml 1 M Magnesiumlösung (1 M MgCl<sub>2</sub> oder 1 M MgSO<sub>4</sub>)  
pH 6,8-7,0

SOC-Medium : 100 ml SOB-Medium, 1 ml 2 M Glukose (die Magnesiumlösung und Glukose wurden vor Gebrauch zur Elektrotransformation steril zugegeben)

LB-Amp(/Strep): LB-Medium + Amp 100 µg / ml (+ 50 µg/ml)

Andere Puffer und Lösungen:

10 x TAE-Puffer: 400 mM Tris / Acetat, 10 mM EDTA, pH 8,3

TE-Puffer: 10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TPBS: 10 x PBS / 0,1 % Tween 20

## Puffer für Western Blot:

Anodenpuffer:	300 mM Tris, 100 mM Tricin, pH 8,7
Kathodenpuffer:	300 mM AC, 30 mM Tris, pH 9,2
Färben/Entfärben:	25 % Methanol, 10 % Essigsäure (0,02 % ServaBlue G)
PBS:	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 mM NaCl, pH 7,5
Tx PBS <sub>1</sub>	PBS/ 0,1 % Tx
Tx PBS <sub>2</sub>	PBS/ 0,5 % Tx

ECL 1- Lösung:	90 ml H <sub>2</sub> O
	+ 10 ml Tris [1M, pH 8,5]
	+ 1 ml Luminolstammlösung [250 mM in H <sub>2</sub> O]
	+ 0,5 ml Coumarinstammlösung [90 mM in DMSO]

ECL 2- Lösung:	90 ml H <sub>2</sub> O
	+ 10 ml Tris [1M, pH 8,5]
	+ 100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [30%]

Entwickler	180 ml GBX/ 1000 ml H <sub>2</sub> O
Fixierbad	180 ml GBX/ 1000 ml H <sub>2</sub> O

## Puffer für die SDS-Gele:

10 x Kathoden-Laufpuffer:	1M Tris, 1M Tricin, 1% SDS
10 x Anoden-Laufpuffer (pH 8,9):	1M Tris, 0,225M HCl
3 x SDS Gelpuffer (pH 8,45):	3M Tris, 1M HCl, 0,3% SDS
Fixieren:	50 % Methanol, 10 % Essigsäure
Färben/Entfärben:	10 % Essigsäure (0,025 % ServaBlue G)

## Puffer für Fv-Reinigung:

Äquilibrierungspuffer:	50 mM Tris/Cl pH 8,0
Elutionspuffer:	2,5 mM Desthiobiotin (Sigma, Deisenhofen)
	1 mM PMSF
	1 mM EDTA
	0,05 % Azid
Lagerpuffer:	1 mM EDTA, 0,05 % NaAzid
Avidin Stock:	10 mg / ml, Lagerung bei -20 °C

## Verwendete Stämme :

Stamm	Genotyp
XL-10 Gold	Tet <sup>R</sup> Δ(mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte (F <sup>R</sup> proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM 15Tn10 (Tet <sup>R</sup> ) Amy Cam <sup>R</sup> )
JM83	SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F <sup>-</sup> [proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZ ΔM15 Tn10(tet <sup>-</sup> )]

Tabelle 4: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

## Verwendete Plasmide:

Plasmid	Größe	Eigenschaften	Herkunft
TA (pCR <sup>®</sup> 2.1)	3,9 kb	vgl. Produktbeschreibung	Invitrogen Groningen (Niederlande)
pASK68	3973 bp	Klonierungs- und Expressionsvektor	Kleymann et al., 1995

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

## Geräte:

## Geräte zur Proteinreinigung:

Biosys 2000 Protein-Reinigungs-Workstation<sup>®</sup>, Beckman Instruments GmbH (München)

Q Hyper D 10 Säule (4,6 mm x 1000 mm), Beckman Instruments GmbH (München)

TSKgel G4000 SW Säule (21,5 mm x 600 mm), Toso Haas GmbH (Stuttgart)

Ultrafree – 20 Centrifugal Filter Unit<sup>®</sup> mit Biomax<sup>™</sup> - 30 High Flux Polysulfone Membrane, Millipore GmbH (Eschborn)

## Zentrifugen:

Heraeus Holding GmbH, Hanau; Biofuge A

Heraeus Holding GmbH, Hanau; Labofuge 400

Heraeus Holding GmbH, Hanau; Minifuge GL

Heraeus Holding GmbH, Osterode; Cryofuge 8000 Sorvall

Kühlzentrifuge J2-21, Beckman Instruments GmbH (München)

- Ultrazentrifugen L7-65 und L8-70M, Beckman Instruments GmbH (München)
- Rotoren: JA-10, JA-20, JS13.1, Beckman Instruments GmbH (München)  
Ti 45, Ti 50.2, Ti 70.1, Beckman Instruments GmbH (München)  
TFT 50.38 Kontron Instruments (Eching)
- Photometer: Hoefer<sup>®</sup>DyNA Quant<sup>®</sup>200Fluorometer, Amersham /Pharmacia /LKB (San Francisco)  
UV 300 Zweiwellenlängen / Doppelstrahlphotometer, Shimadzu (Düsseldorf)  
U-3210 Doppelstrahl Spektralphotometer, Hitachi (Düsseldorf)
- Termocycler: Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer (Weiterstadt)  
Perkin Elmer GeneAmp<sup>®</sup>PCR System 2400, Perkin Elmer (Weiterstadt)  
Cyclone<sup>R</sup>Gradient, peqlab (Erlangen)
- Elektrotransformator: *E. coli* Pulser, Bio-Rad (Hercules, USA)
- Weitere Geräte: ABI Prism Automated Sequencer Typ ABI 310, Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt)  
Desintegrator-C, Bernd Euler (Frankfurt am Main)  
Fermenter 10 l, Biostat E; Braun (Melsungen)  
Fotokamera MP4 land camera, Polaroid GmbH (Offenbach)  
Rüttler (Eppendorf Mixer 5432), Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg)  
UV-Transluminator TF 20M, 312 nm, Herolab (Wiesloch)
- DNA Analyseprogramme:  
HIBIO DNASIS<sup>™</sup> for Windows<sup>®</sup> Version 2, Hitachi Software Engineering Co., Ltd., (San Francisco, USA)  
Sequence Navigator, Applied Biosystems (Weiterstadt)

Sequenzalignment: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Chemikalien: Coomassie Blau G-250, Harnstoff, PEG 4000, SDS (Serva, Heidelberg), Tricin (Sigma, Deisenhofen), Y31A8, Triton X-100 (Serva, Heidelberg), Ammoniumpersulfat; Agar (Gibco BRL Life Technologies), Hefextrakt, Trypton (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe); Yeast Extract (Life Technologies, Paisley, Scotland); Pepton, Agarose (Biorad Laboratories GmbH), Ampicillin, Epps, Ethidiumbromid, Glukose, Glycerin, Glycon, Hexaminruthenium (III)-chlorid (HAR), Hepes (Sigma, Deisenhofen), KCN, Kaliumhexacyanoferrat(III), Mercaptoethanol, Mops (Sigma, Deisenhofen), d-NADH, NADH, Natriumazid, DMSO (Sigma, Deisenhofen), TEMED, PMSF, Tween 20 (Serva, Heidelberg), Tris (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen), EDTA, Amminicaprionsäure (Fluka), Ammoniumsulfat, KCl, KOH, KPi, NaCl, NaOH, NaPi, Natriumcitrat, Natriumacetat, Natrium-Azid, Saccharose, X-Gal (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe); ATP, Nukleotide (Pharmacia GmbH, Erlangen oder MWG-Biotech, Ebersberg); Bacto™Peptone (Difco Laboratories), YNB (Difco Laboratories, Detroit, USA); Borsäure, Phenol, Wasserstoffperoxid (Fluka AG, Buchs, Schweiz); IPTG (BioTech & Trade Service GmbH, St. Leon-Rot), Serva Blue Gel (Serva, Heidelberg); Desthiobiotin, Isoamylalkohol, Isopropanol, Magnesiumsulfat, Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt), Essigsäure; Laurylmaltosid (LM) (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg); Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Holland); Acrylamid (Serva, Heidelberg), Bisacrylamid (Serva), Avidin (Fluka), Streptavidin-AP (Amersham), Rinderserumalbumin (Behringwerke AG, Marburg); Hygromycin B (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande); BCIP/NBT Tabletten (Sigma, Deisenhofen), Luminollösung (Sigma, Deisenhofen), Coumarinlösung (Sigma, Deisenhofen); Röntgenfilme Typ 667 (Polaroid GmbH, Offenbach); Entwickler- und Fixierlösung für Röntgenfilme (Kodak AG, Stuttgart-Wangen); DEAE Bio-Gel A Gel Agarose (Biorad Laboratories GmbH, München); Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

Detergentien: Natrium-dodecylsulfat (SDS), Tween 20, Laurylmaltosid (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierungs- und Expressionsstrategie

Die aus Hybridomzellen gewonnene mRNA der Klone Y30C12 und Y34C10, war Ausgangspunkt zur Synthese der schweren und der leichten Kette der Fv-Fragmente durch die RT-PCR. Die Klonierung von VH und VL erfolgte zunächst in den TA-Vektor (Invitrogen), der eine einfache Klonierung von PCR-Fragmenten erlaubt (siehe im Anhang unter 5.5). Nach Sequenzierung erfolgte die Umklonierung in den Expressionsvektor pASK68 (Kleymann et al., 1995; Abb. im Anhang unter 5.6) und Transformation in den *E. coli* Stamm JM 83 für Expressionsversuche.

Die Klonierung der schweren Kette erfolgte über die Schnittstellen Pst I und BstE II, die der leichten Kette über die Schnittstellen Sac I und Xho I (Bild 6).



Bild 6: Schematische Übersicht der Klonierungsregion des Expressionsvektors pASK68.

Zu erkennen sind hier die Lage der Signalsequenzen N-terminal, der Affinitätstags C-terminal (Strep-Tag an VH und c-myc-Tag an VL), und die zur jeweiligen Kette gehörigen Schnittstellen.

#### 3.2 Klon Y30C12

##### 3.2.1 RT-PCR

Nach Synthese der cDNA, wurden die VH- und VL-Regionen der Fv's mittels PCR mit den Primern VKC1T, VKC2T, VKR1T für die leichte Kette, sowie VHC1T und VHR1T für die schwere Kette (Sequenzen unter 2.1.2.3) amplifiziert (Bild 7).

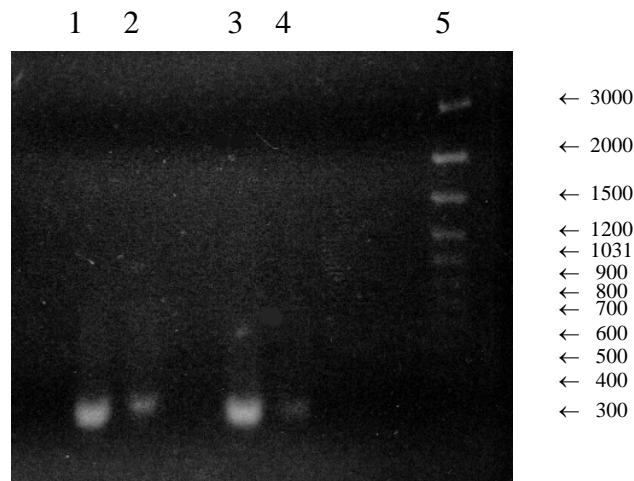


Bild 7: Y30C12, Präparatives Gel mit PCR-Produkten. In den Banden 2 und 4 sind die PCR-Produkte der schweren Kette (VH) zu sehen. In den Banden 1 und 3, die der leichten Ketten (VL). In der Bande 5 wurde die 100 bp Ladder Plus aufgetragen.

### 3.2.2 Klonierung und Expressionsniveau

Die Sequenzierung von vier untersuchten Klonen (TA Vektor) ergab eine identische Sequenz. Die abgeleitete Proteinsequenz der schweren und leichten Kette des Fv Y30C12 im pASK68 ist im Bild 8 gezeigt.

Bereits bei der Testexpression zeigte sich im Western Blot anhand der Banden beim Nachweis des Strep-Tag und c-myc-Tag, dass nur eine quantitativ unzureichende Expression erzielt werden konnte (Bild 9...11).

Zur Steigerung der Expressionsrate des Klons wurden in die Sequenz Punktmutationen eingeführt (3.2.3).

Schwere Kette Y30C12:  
EVKLQESGAGLVRPGASVMLSCKASGYFSRFRWMQWVKQRPGQGLE  
 N-Terminus VH  
 WIGSIYPGDGDTRYTQKFKGKATLIADKSSSTAYMQLSNLASEDSAIYFC

ARKDANDNAWLAYWGQGQGTTVTSSAWRHPOFGG  
 C-Terminus VH mit Strep-Tag

Leichte Kette Y30C12:  
DIELTQTPVSLAVSLGDQASISCRSSQSLVHTYGATYLEWYLLKPGQSPIL  
 N-Terminus VL  
 LIYKVSKRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPW

TFGGGTKLEIKREOKLISEEDL  
 C-Terminus VL mit *c-myc-Tag*

Bild 8: Proteinsequenz  $V_H$  und  $V_L$  des Fv-Fragmentes des Klons Y30C12. Zur näheren Erläuterung der fettgedruckten Aminosäuren siehe unter 3.2.3

### 3.2.3 Punktmutagenese des Klones Y30C12

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde eine Steigerung der Expressionsrate von Antikörperfragmenten durch Punktmutationen beschrieben. In der Publikation von Forsberg et al., 1997 wurden die Aminosäuren an den Positionen 77 und 78 innerhalb der leichten Kette mutiert, sowie zusätzlich an Position 10 ein Phenylalanin gegen ein Serin ausgetauscht. Dadurch konnte eine Expressionssteigerung in *E. coli* von Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers 5T4 erreicht werden. Bei dem Klon Y30C12 war an Position 10 der Aminosäuresequenz bereits ein Serin enthalten (Bild 8).

Bei der Punktmutation ging es um den gezielten Austausch der Aminosäuren Tyrosin (ACA) auf Position 77 gegen Serin (TCA) und Leucin (CTC) auf Position 78 gegen Valin (GTC) in der leichten Kette von Y30C12. Die Sequenzierung von vier mutierten Klonen ergab, dass die Mutationen bei sonst identischer Sequenz enthalten waren. Y30C12-M, wurde erneut exprimiert.

### 3.2.4 Expressionsniveau von Y30C12, SLK-pASK68; Vergleich nativ-mutiert

Für die Testexpression wurde wie unter 2.2.4 angegeben verfahren. Fünf Stunden nach Animpfen der Hauptkultur betrug die  $OD_{550}$  0,52 und es wurde mit IPTG induziert. Um den zeitlichen Verlauf der Expression verfolgen zu können, wurde ein Teil der Kolben nach 90 min geerntet und der Rest nach drei Stunden. Das Periplasma wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Strep-Tag bzw. der c-myc-Tag wurden immunologisch detektiert (Bild 9,10).

Durch die Punktmutationen konnte eine Expressionssteigerung erreicht werden (siehe Bild 9...11). Aus einem Vergleich mit dem Klon Y31A8, einem konformations-spezifischen Antikörper gegen Komplex I, war allerdings ersichtlich, dass die Expressionsrate unter allen getesteten Bedingungen deutlich geringer war. Der Klon Y31A8 wurde aufgrund seiner hohen Expressionsrate in dieser Arbeit vielfach als Positivkontrolle eingesetzt. Es zeigte sich vor allem die Expression der schweren Kette des Fv Y30C12 als problematisch (Bild 9).

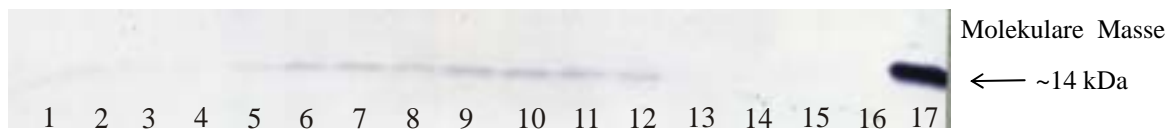


Bild 9: Analyse des Expressionsniveaus Klon Y30C12 Wildtyp (Wt) und Mutante (Mut) in Abhängigkeit von der Expressionsdauer. Nachweis des Strep-Tag an der schweren Kette. Alle Klone wurden induziert. Zuordnung der Klone in den folgenden Tabellen:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8
Klon #	1, Wt	2, Wt	3, Wt	4, Wt	1, Mut	2, Mut	3, Mut	4, Mut
Expressionsdauer	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h

Bahn	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Klon#	1, Mut	2, Mut	3, Mut	4, Mut	1, Wt	2, Wt	3, Wt	4, Wt	Y31A8
Expressionsdauer	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	3 h

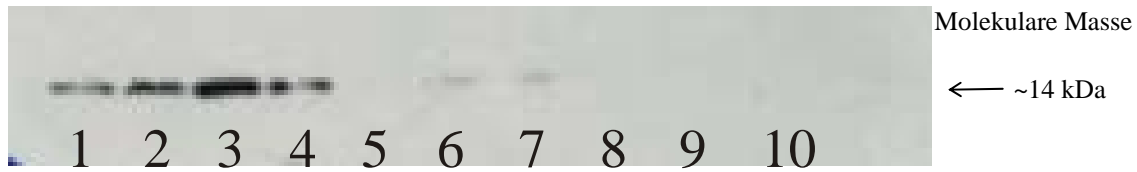


Bild 10: Y30C12, SLK1-pASK68-nativ, c-myc-Tag (leichte Kette) Nachweis im ECL-Immunoblot.

UV-Exposition: 2 min. Zuordnung der Bahnen nach folgender Tabelle:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Klon #	4,	3,	2,	1-2,	1-1,	4,	3,	2,	1-2,	1-1,
Expressionsdauer	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min
Induziert	x	x	x	x		x	x	x	x	

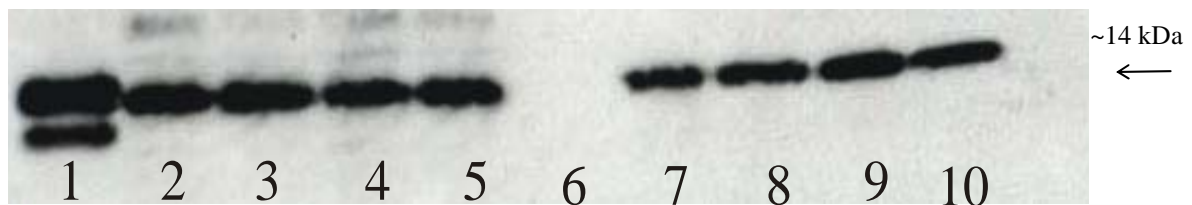


Bild 11: Y30C12, SLK-M-pASK68, c-myc-Tag (leichte Kette) Nachweis im ECL-Immunoblot.

UV-Exposition: 2 min. Zuordnung der Bahnen nach folgender Tabelle:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Klon #	Y31A8	4,	3,	2,	1-2,	1-1,	4,	3,	2,	1-2,
Expressionsdauer	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	90 min	90 min	90 min	90 min
Induziert	x	x	x	x	x		x	x	x	x

Die Expressionsbedingungen für die Proben in den Bahnen 2-6 (Bild 11) entsprechen denen in der oberen Abbildung (Bild 10) in den Bahnen 1-5.

Die Expression des mutierten Fv Y30C12 zeigte sich hinsichtlich des Expressionsniveaus allerdings ebenfalls als unzulänglich, da selbst bei einem 12 l-Ansatz die Menge an Fv-Fragmenten für Kristallisationsversuche nicht ausreichend war. Es wurden die Klone 1, 2, 4 (siehe 4-3h; 2-90 min; 1-2-90 min), die in der Testexpression als geeignet schienen, zur Expression gebracht, aber bei keinem ließ sich eine akzeptable Proteinmenge erhalten, mit der hätte weiter gearbeitet werden können. Es ließ sich anhand von Sequenzanalysen (siehe unter 4.3) zunächst nicht sicher eruieren, ob diese quantitative Limitierung durch die schwere oder leichte Kette bedingt war. Der Strep-Tag und c-myc-Tag Nachweis der Fv's im Vergleich lässt erkennen (3.2.4), dass nach den Punktmutationen in der leichten Kette eine deutliche Expressionssteigerung erreicht werden konnte, so dass die Limitierung möglicherweise durch die schwere Kette bedingt war.

Auch durch die Verwendung eines anderen Klones beziehungsweise durch neue Transformation unmittelbar vor dem Expressionsversuch, konnte keine signifikante Steigerung des Expressionsniveaus von Y30C12-M erreicht werden.

### 3.3 Klon Y34C10

#### 3.3.1 RT-PCR

Nach Synthese der cDNA, wurden die VH- und VL-Regionen der Fv's mittels PCR mit den Primern VKC1T, VKC2T, VKR1T für die leichte Kette, sowie VHC1T und VHR1T für die schwere Kette (Sequenzen unter 2.1.2.3) amplifiziert (Bild 12).

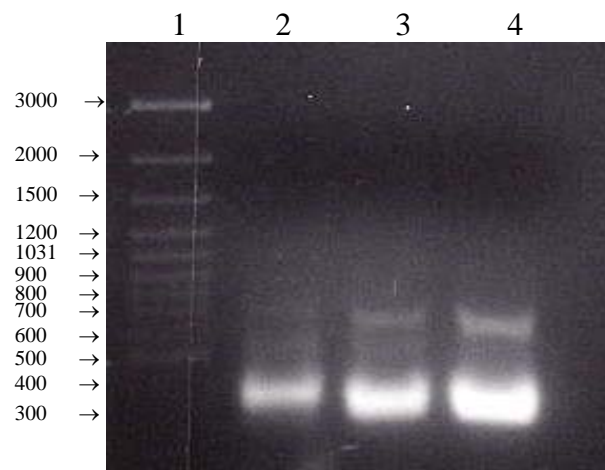


Bild 12: Y34C10, Präparatives Gel mit PCR-Produkten. In der Bande 2 ist das PCR-Produkt der schweren Kette zu sehen, in den Bahnen 3 und 4 die der leichten Kette. In der Bande 1 wurde die 100 bp Ladder Plus aufgetragen.

#### 3.3.2 Klonierung und Testexpression von Fv Y34C10

Von den vier untersuchten Klonen (TA Vektor) konnte eine identische Sequenz erhalten werden. Die Proteinsequenz der schweren und leichten Kette des Fv Y34C10 im pASK68 ist im Bild 13 abgebildet.

Schwere Kette Y34C10:

EVKLQESGAGLVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWLSWLKQGPQGGLDWIGM

N-Terminus VH

IHPSDSETRLNQNFKDKATLAVDNSSNTAHMQLSSPTSEDSAVYYCARTLLW

WDHFDYWGQGTTVTVSSAWRHPQFGG

C-Terminus VH mit *Strep-Tag*

Leichte Kette Y34C10:

DIELTQTPVSLAASPGEKITITCNASSTISSNYLHWYQLKPGFPELLIFRTS

N-Terminus VL

ILASGVPVRFSGSGSGTSFSLTIDTMVAEDVATYYCQQGSVIPYTFGGGK

LEIKREQKLISEEDLN

C-Terminus VL mit *c-myc-Tag*

Bild 13: Proteinsequenz von  $V_H$  und  $V_L$  des Klons Y34C10 im pASK68

Nach Sequenzierung wurde in den *E. coli*-Stamm JM 83 transformiert. Vier Klone wurden für die Testexpression selektiert. Nach 4,5 h konnte mit IPTG induziert werden, da zu diesem Zeitpunkt die  $OD_{550}$  von 0,54 gemessen wurde. Ein Klon (1-1) wurde zum Vergleich nicht mit IPTG induziert. Die Ernte erfolgte nach einer vorgegebenen Zeitreihe nach 90 min und 3 Stunden.

Um einen Einblick in das Expressionsniveau dieses Klons zu erhalten, wurde ein Nachweis auf die Anwesenheit der schweren Kette durchgeführt. Die Anwesenheit des Strep-Tag an der schweren Kette, wie auch die Anwesenheit des c-myc-Tag an der leichten Kette, wurden durch den Western Blot bestätigt (Bild 14, 15). Als Positivkontrolle wurde der Klon Y31A8 eingesetzt.

### 3.4 Y34C10, SLK-pASK68

#### 3.4.1 Detektion des Strep-Tag an der schweren Kette

Für den Nachweis der schweren Kette wurde ein SDS-Gel angefertigt und geblottet.



Bild 14: Western-Blot mit Periplasma. Analyse des Expressionsniveaus Klon Y34C10 in Abhängigkeit von der Expressionsdauer. Nachweis des Strep-Tag an der schweren Kette.

Zuordnung zu den Klonen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Klon #	4,	3,	2,	1-2,	1-1,	4,	3,	2,	1-2,	1-1,	Y31A8
Expressionsdauer	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	3 h
Induziert	x	x	x	x		x	x	x	x		x

Im Vergleich zur Kontrolle Y31A8 zeigte sich hier ein schwaches Expressionsniveau, welches sich allerdings nach der Induktionszeit differenzieren ließ. Die Banden im höhermolekularen Bereich entsprachen möglicherweise biotinylierten Proteinen.

#### 3.4.2 Detektion des c-myc-Tag an der leichten Kette

Für den c-myc-Tag Nachweis wurde ein SDS-Gel angefertigt (siehe ECL-Immunoblot, 2.2.3.1), welches in der Reihenfolge der Bahnen die gleichen Periplasmaproben enthielt, wie sie für den Strep-Tag Nachweis verwendet wurden.



Bild 15: Y34C10, SLK-pASK68, ECL-Immunoblot. UV- Exposition: 10 s. Zuordnung der Klone zu den entsprechenden Bahnen sind in der Tabelle einzusehen:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Klon #	4,	3,	2,	1-2,	1-1,	4,	3,	2,	1-2,	1-1,	Y31A8
Expressionsdauer	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	90min	90min	90min	90min	90min	3 h
Induziert	x	x	x	x		x	x	x	x		x



### 3.4.3 Reinigung und FPLC-Gelfiltration der Fv-Fragmente von Y34C10

Zur Expression der Fv-Fragmente des Klons Y34C10 wurden je 6 l Hauptkulturen angeimpft. Nach 4,5 h konnte mit IPTG induziert werden und nach weiteren drei Stunden wurde geerntet. Aus 6 l Hauptkultur konnten insgesamt 350 µg Fv über eine *core*-Streptavidin Säule gereinigt werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 58 µg/l Kultur für das Fv 34C10 im Vergleich zu ca. 500 µg/l Kultur für das Fv-Fragment Y31A8. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht (Bild 16).

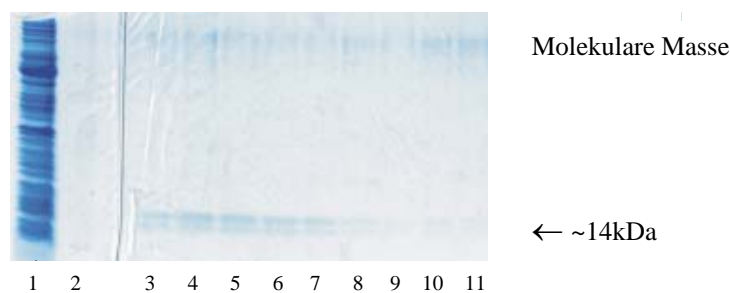


Bild 16: Reinigung des Fv34C10. Fraktionen der *core*-Streptavidinsäule auf einem 4/10 SDS-Gel. In den Bahnen 3-11 befinden sich die über die *core*-Streptavidinsäule gereinigten Fv-Fragmente. In der Bahn 1 befindet sich die Proteinmischung des Periplasmas, das bei der Produktion gewonnen wurde. Aus den gepoolten Fraktionen erfolgte die Aufkonzentration der Fv's.

Die aus dem Periplasma von *E. coli* gewonnenen Fv-Fragmente (Y34C10) sollten zur Ko-Kristallisation eingesetzt werden. Dabei galt das Augenmerk nicht nur der quantitativen Ausbeute. Weiteres Interesse galt der Fähigkeit der Fv-Fragmente an die NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) zu binden.

Durch die FPLC-Gelfiltration konnte letztlich erst eine Aussage über die Bindungseigenschaften gemacht werden. Es wurde überprüft, ob bei einem Fv-Überschuss, der zusammen mit dem Antigen (Komplex I) über die Säule gegeben wurde tatsächlich ein stöchiometrischer Komplex im Verhältnis 1:1 gebildet wird.

Ein 1:1 Komplex ist wesentlich für das Gelingen der Kristallisation des Ko-Komplexes. Dieses wird am ehesten durch Zugabe eines Überschusses an Fv-Fragmenten zum Komplex I erreicht, wobei durch schnelle Gelfiltration ungebundene Fv-Fragmente wieder entfernt werden und die Wahrscheinlichkeit reduziert werden kann, dass der Ko-Komplex wieder dissoziiert.

Es wurden 7 mg gereinigter Komplex I mit 350  $\mu$ g Fv 34C10 inkubiert. Dies entspricht einem 1,5-fachen Überschuss des Fv-Fragmentes. Die Mischung wurde dann auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (Bild 17).

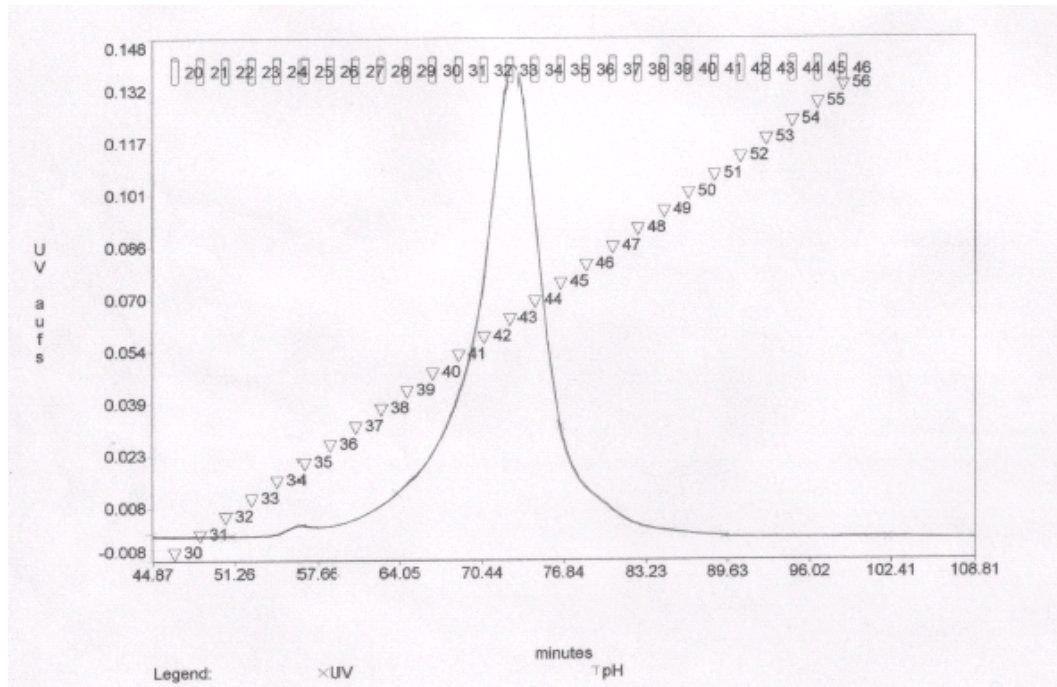


Bild 17: FPLC-Gelfiltration einer Mischung aus Komplex I und Fv-Fragment Y34C10  
Der Hauptpeak enthält den Ko-Komplex. (vgl Bild 18)

### 3.5 Bindungsnachweis des Fv Y34C10 an Komplex I

Zur Charakterisierung der gewonnenen Fraktionen der Gelfiltration (Bild 17) wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Bild 18).

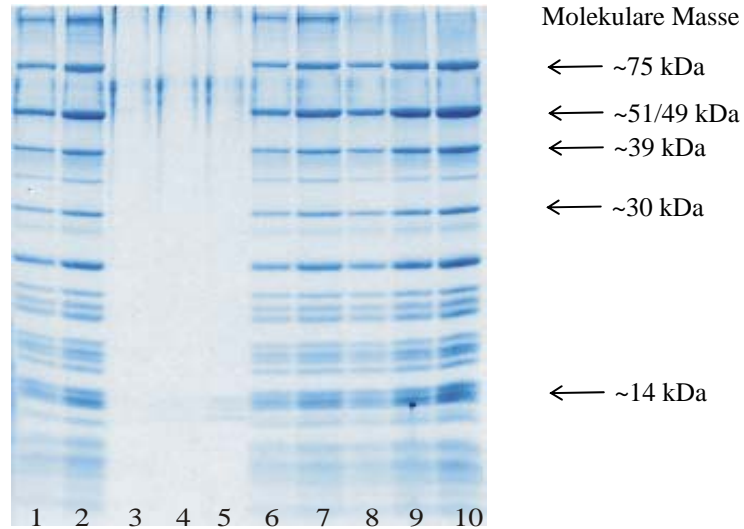


Bild 18: SDS-Gel (4/16), Y34C10; Komplex I, Fv-Fragmente und gebundene Fv's in verschiedenen Konzentrationen. Die Zuordnung der Bahnen sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	KI	KI	Fv	Fv	Fv	KI+ Fv	KI+ Fv	KI+ Fv	KI+ Fv	KI+ Fv
Gesamt [ $\mu\text{g}$ ]	10	20	0,1	0,5	1	10	20	10	20	40
Im zeitlichen Verlauf						vor der Gelfiltration		nach der Gelfiltration		

Mit Hilfe des Strep-Tag Nachweises konnte gesichert werden, dass Fv Y34C10 tatsächlich an Komplex I gebunden hatte (Bild 19).

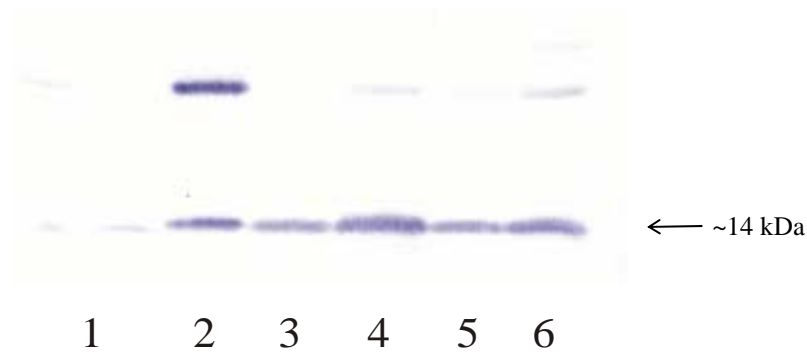


Bild 19: Y34C10, Nachweis des Strep-Tag vor und nach Gelfiltration zur Kontrolle der Bindungsfähigkeit der gewonnenen Fv's an Komplex I. Die Zuordnung der Bahnen zu den Proben erfolgt in folgender Tabelle:

Bahn	1	2	3	4	5	6
Probe	Reiner Komplex I, 20 µg	Y34C10 Periplasma, unverdünnt	KI + Fv, 10µg	KI + Fv, 20µg	KI + Fv, 10µg	KI + Fv, 20µg
Im zeitlichen Verlauf			vor der Gelfiltration		nach der Gelfiltration	

Wie aus diesem Nachweis deutlich wird, erkennen und binden die Fv-Fragmente Komplex I.

### 3.6 Kristallisation und Bedingungen

Die Bedeutung der Fällungsmittel- und Proteinkonzentration wurde bereits unter dem Punkt 1.3.1 diskutiert. Das Polymer PEG (Polyethylenglykol) gilt für Komplex I im Bereich zwischen 5 % - 8 % als ein wichtiger Faktor zum möglichen Erhalt von Kristallen, was aus vorhergehenden Versuchen eruiert werden konnte. Auch für Ammoniumsulfat konnten die Testbedingungen vorher eingegrenzt werden (siehe Tabelle 6).

Bei den pH-Werten wurde zwischen pH = 5 und pH = 9 variiert. Da die Temperatur u.a. bei der Äquilibrierungsgeschwindigkeit einflussnehmend ist, kann sie unter bestimmten Bedingungen auch Einfluss auf die Kristallgröße nehmen (Mikol et al., 1990). Die Kristallisationsansätze wurden jeweils bei 4°C und 18°C gelagert.

### 3.6.1 Kristallisationsversuch mit dem Fv-Fragment Y34C10

Bei dem Kristallisationsversuch sollte der Einfluss von Salz, pH-Wert, der Konzentration des Fällungsmittels und der Temperatur überprüft werden.

Für die Kristallisationsversuche wurde Komplex I nach der Gelfiltration mit einer Konzentration von 14,2 mg/ml eingesetzt.

Diejenige Platte, die bei 4°C aufbewahrt wurde, zeigte auch nach mehreren Wochen noch keine Granulatbildung beziehungsweise keine Kristallbildung. Die Platte, die bei 18°C gelagert wurde, wies bereits nach einer Woche erste kleine Granulate auf, welche mikroskopisch erkannt werden konnten. Die ersten deutlichen Granulate waren in den Ansätzen D2 bis D6 zu sehen (Tabelle 6).

Well	Mutterlauge	PH	Zusatz	Tropfen
A1	5% PEG 4000	5,6	Citrat	Klar
A2	6% PEG 4000	5,6	Citrat	Klar
A3	7% PEG 4000	5,6	Citrat	GR+
A4	8% PEG 4000	5,6	Citrat	GR+
A5	4% PEG 4000	5,6	ADA	Klar
A6	5% PEG 4000	5,6	ADA	GR
B1	6 % PEG 4000	5,6	ADA	GR++
B2	5 % PEG 4000	7,5	HEPES	GR++
B3	6 % PEG 4000	7,5	HEPES	GR++
B4	6 % PEG 4000	8,0	TrisCl	GR++
B5	7 % PEG 4000	8,0	TrisCl	GR++
B6	6% PEG 4000	8,0	TrisCl	Klar
C1	7% PEG 4000	8,5	TrisCl	Klar
C2	8 % PEG 4000	8,5	TrisCl	GR++
C3	1,2 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	5,0		GR++
C4	1,2 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	6,0		Klar
C5	1,2 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	7,0		Klar
C6	1,2 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	8,0		GR
D1	1,2 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	9,0		GR+
D2	1,6 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	5,0		GR++
D3	1,6 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	6,0		GR++
D4	1,6 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	7,0		GR++
D5	1,6 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	8,0		GR++
D6	1,6 M [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	9,0		GR++

Tabelle 6: Kristallisationsansätze bei 18°C unter verschiedenen Bedingungen und deren Resultate.  
Alle entsprechenden Ansätze bei 4°C waren klar.

Es konnte unter den getesteten Bedingungen allerdings keine Kristallbildung des Ko-Komplexes beobachtet werden.

## 4 Diskussion

Trotz des Erkenntnisfortschritts, der hinsichtlich der Zusammensetzung und der strukturellen Organisation des Komplex I erreicht wurde, ist nach wie vor nur wenig über den Elektronentransfer von NADH auf Ubichinon und die daran gekoppelte vektorielle Protonentranslokation über die mitochondriale Membran bekannt (Brandt, 2006).

Struktur- und Funktionsanalysen bezüglich des Elektronen- und Protonentransportes des Komplex I lassen sich letztlich nur auf der Grundlage einer Struktur mit mindestens molekularer Auflösung erreichen. Dies konnte in den letzten Jahren an verschiedenen Komplexen der Atmungskette verdeutlicht werden. Die Bestimmung von Strukturen mit hoher Auflösung gelang mittels Kristallisation bei der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), der Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III), der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV), dem peripheren F<sub>1</sub>-Teil der ATPase (Komplex V) und dem peripheren Anteil der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus verschiedenen Organismen. Die dadurch bekannt gewordene Anordnung der Redoxgruppen und den benachbarten Aminosäurenketten ermöglichte durch experimentell überprüfbare Modelle ein Verständnis der einzelnen Reaktionsschritte dieser Enzyme (Iwata et al., 1995; Zhang et al., 1998; Yu et al., 1999; Hunte et al., 2000; Lange and Hunte, 2002; Huang et al., 2005; Hinchliffe and Sazanov, 2005). Die Aufklärung der Struktur des gesamten Komplex I scheiterte bis jetzt hingegen an der Schwierigkeit, geeignete Kristalle des membranständigen Gesamtkomplexes für die Röntgendiffraktion zu züchten. In dieser Arbeit sollten Fv-Fragmente als Hilfsmittel für die Kristallisation (Hunte and Michel, 2002) gewonnen werden.

### 4.1 Y30C12 - Bindungsort am Komplex I

Die monoklonalen IgG Antikörper des Klones Y30C12 sind gegen die NUWM-Untereinheit des Enzymkomplexes NADH:Ubichinon Oxidoreduktase gerichtet. Die NUWM-Untereinheit ist im Membranarm von Komplex I lokalisiert. Sie umfasst neben einem Transmembransegment, zwei extramembranöse Domänen. Die Fv-Fragmente binden die Untereinheit an der extramembranösen Domäne auf der zytosolischen Seite des Membranarms (Abdrakhmanova et al., 2004; Bild 20). Da der Antikörper an den hydrophoben Bereich von Komplex I bindet, ist er für Kristallisationsversuche gut geeignet.

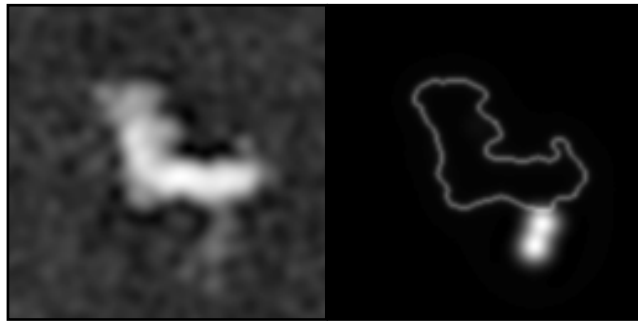


Bild 20: 2D-Struktur von AK- gebundenen Komplex I. Fv Y30C12 erkennt und bindet das native Antigen, die NUWM-Untereinheit, auf der zytosolischen Seite des Membranarms (Abdrakhmanova et al., 2004)

Das Expressionsniveau der Fv-Fragmente des Klons Y30C12 konnte trotz Variation der Bedingungen nicht soweit gesteigert werden, dass eine ausreichende Menge für Bindungsversuche gegen den Komplex I vorlag.

Ein Versuch zur Expressionssteigerung basiert auf den Arbeiten von Forsberg et al., 1997, in der eine Zunahme der Expressionsrate auf mehr als das 15-fache durch Punktmutationen in der Sequenz von Fab-Fragmenten beschrieben wird. Diese vom monoklonalen Antikörper 5T4 abgeleiteten Fab-Fragmente wurden ebenfalls in *E.coli* exprimiert und sind gegen menschliche tumorassoziierte Antigene gerichtet. Als solche wurden sie in der Immuntherapie bei nicht kleinzelligen Bronchial-Carcinomen eingesetzt.

Durch gezielte Punktmutationen wurden in der Sequenz von Y30C12 an verschiedenen Positionen bestimmte Aminosäuren durch andere ersetzt. Es wurden auf Position 77 das vorhandene Tyrosin gegen ein Serin ersetzt. Auf Position 78 wurde Leucin gegen Valin getauscht. Durch die Punktmutationen konnte bei dem Klon Y30C12-M eine gesteigerte Ausbeute ermöglicht werden, was sich mittels eines immunologischen Nachweises im Expressionsniveau besonders für die leichte, aber auch für die schweren Kette zeigte (siehe Bild 9...11). Dennoch war die Ausbeute der Fv-Fragmente für den Einsatz in Kristallisationsversuchen nicht ausreichend. Unter den getesteten Bedingungen, erwies sich die geringe Menge an schwerer Kette des Fv-Fragmentes 30C12-M als limitierend (siehe 3.2.4).

#### 4.2 Y34C10 - Bindungsort an der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase

Der Klon Y34C10 produziert IgG-Typ-Antikörper vom Subtyp IgG1, die gegen die 49 kDa-Untereinheit der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase gerichtet sind. Eine Kreuzreaktion mit anderen Untereinheiten konnte in vorangegangenen Western-Blot Untersuchungen nicht beobachtet werden. Die Antikörper des Klons Y34C10 binden an ein sequenzielles Epitop

(VLRILELSG) in der hydrophilen Untereinheit (siehe Sequenz unter 5.4 im Anhang), die sich im peripheren Arm des L-förmig konfigurierten Komplex I befindet. Der Antikörper bindet sehr stark an den Komplex I (Bild 21, 22).

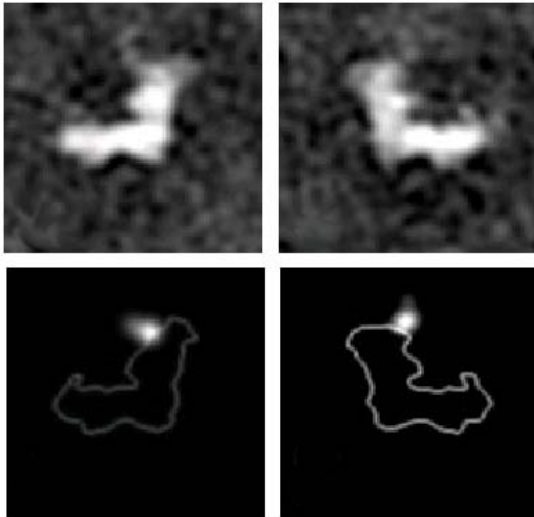


Bild 21: 2D-Darstellung von AK-gebundenen Komplex I

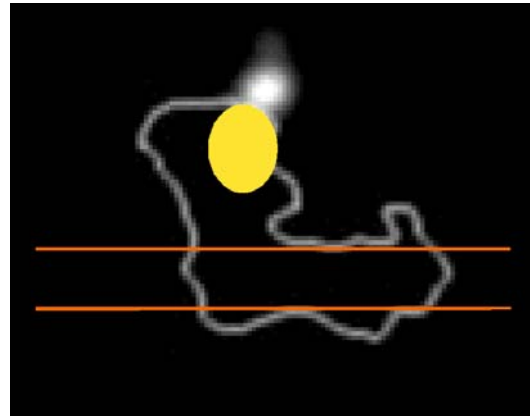


Bild 22: Schematische Repräsentation der 49 kDa-Untereinheit in seiner Position mit gebundenem Antikörper Y34C10 (Abb. aus Zickermann et al., 2003)

Die Expression der Fv-Antikörperfragmente des Klonen Y34C10 führte unter Standardbedingungen (Ostermeier et al., 1995) zu einer zwar geringen, aber ausreichenden Menge an Fv-Fragment für Bindungsversuche mit Komplex I. In der Einschrittreinigung an der core-Streptavidin Säule von Fv-Fragment Y34C10 konnte ein proteinchemisch sauberes Präparat erhalten werden.

Es sollte überprüft werden, in welchen Mengen sich richtig assoziierte Fv-Fragmente reinigen lassen und ob ein homogener, stöchiometrischer 1:1 Komplex zu erhalten ist.

Eine ausreichend feste Bindung zwischen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und dem Fv-Fragment ist für die Isolierung eines homogenen Ko-Komplexes entscheidend. Für die Bestimmung der Bindungsstärke verlässt man sich vor allem auf die empirischen Ergebnisse mit dem jeweilig eingesetzten Fv-Fragment, zumal aus der Affinität des ganzen Antikörpers nur bedingt Informationen für die des Fv-Fragmentes zu erhalten sind. Für die Kristallisation sollte die Bindungsstärke innerhalb des Ko-Komplexes, welcher mittels Gelfiltration isoliert wird, ausreichend stark sein. Die erwähnten Eigenschaften konnten bei dem Fv-Fragment Y34C10 nachgewiesen werden (3.5, Bild 19).



### 4.3 Sequenzanalyse

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Klonen Y34C10 und Y30C12 konnten durch die RT-PCR mit den Standard Primer Paaren (2.1.2.3) PCR-Produkte erhalten werden. Diese wurden in den Expressionsvektor pASK68 kloniert. Die in dem *E. coli*-Stamm JM83 exprimierten Fv-Fragmente konnten mittels der C-terminal fusionierten Affinitätstags im Western Blot nachgewiesen werden. Die Molekulare Masse der Fv-Fragmente mit gebundenen Tags lag wie erwartet im 14 kDa-Bereich.

Alle analysierten Sequenzen der genannten Klone wiesen an definierter Stelle in der schweren und leichten Kette Cysteine auf (in Bild 23 „blau“ unterlegt), die zur Stabilität und korrekten Faltung der Ketten durch Bildung intrachainaler Disulfidbrücken beitragen (Glockshuber et al., 1992). Wie 1993 von Ward et al. beschrieben, hat die Anwesenheit der Cysteine ebenfalls Einfluss auf die Ausbeute bei der rekombinanten Expression in *E. coli*.

Bei dem Vergleich der CDR- und „framework“-Regionen nach der Wu/Kabat Datenbank (Wu and Kabat, 1970; Ostermeier, 1995) zeigte sich, dass die Übereinstimmung in den Sequenzen wie erwartet vor allem in den drei „framework“-Regionen liegen, während die drei CDR-Regionen (CDR1...3) in den einzelnen Klonen bei der schweren und leichten Kette differieren (Bild 23).

#### Schwere Kette:

```

30C12  EVKQLQESGAGLVLRPGASVMLSCKASGYSFSRFWMQWVKQRPQGLEWIGSIYPGDGDTRY 60
31A8   EVKLLQSQSAGLVLRPGASVTLSCASGYSSTTYWMQWVKQRPQGLEWIGAIYPGDGHISF 60
                                     |CDR1|                               |CDR2
34C10  EVKQLQESGAGLVLRPGASVKLSCKASGYSFTSYWLSWLKQGPQGLDWIGMIHPSDSETRL 60
*****:*****          ***** : :*:.*:** *****:*** *.*.*..

30C12  TQKFKGKATL IADKSSSTAYMQLSNLASEDSAIYFCARKDANDNA-WLAYWGQGQGTTVT 119
31A8   SQKFRGKATL TAEKSSSTAYMQLNNLASEDSAVYYCARIYYGNIVRYFDVWGQG--TTVT 118
                                     |CDR3|
34C10  NQNFKDKATL AVDNSSNTAHMQLSSPTSSEDSAVYYCARTLLWWDH--FDYWGQG--TTVT 116
.*:*.:*.*.*.*. .*:**.*:*.*.*. .:*****:*:*.*.* : **** **

30C12  VS- 121
31A8   VSS 121
34C10  VS- 118
**

```

#### Schwere Kette:

```

31A8   EVKLLQSQSAGLVLRPGASVTLSCASGYSSTTYWMQWVKQRPQGLEWIGAIYPGDGHISF 60

```

```

                                [CDR1]                                [ CDR2]
30C12  EVKLQESGAGLVRPGASVMLSCKASGYSFSRFWMQWVKQRPQGLEWIGSIYPGDGDTRY 60
5T4    EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGVTLY 60
      **:*:*:**.**:*:*:*:* :***** : :*:***** *:*:*:* :

```

```

31A8   SQKFRGKATLTAEKSSSTAYMQLNLNLASEDSAVYCARIYYGNIVRYFDVWGQG--TTVT 118
      ]
30C12  TQKFKGKATLIADKSSSTAYMQLNLNLASEDSAIYFCARKDANDNA-WLAYWGQGQGTTVT 119
5T4    NQKFKDKAILTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYCARSTMITNY-VMDYWGQV--TSVT 117
      .***:*:* * .:*:*:*:*:* * .:*:*:*:*:* : *** *:*

```

```

31A8   VSS 121
30C12  VS- 121
5T4    VSS 120
      **

```

## Leichte Kette:

```

34C10  DIELTQTPVSLAASPGEKITITCNASSTISS----NYLHWYQLKPGFSPELLIFRTSILA 56
31A8   DIELTQSPFSLASASLGDRVTISCRASQDIS----NYLNWYQKPDGTVKLLIYYTSKLH 55
      ]
30C12M DIELTQTPVSLAVSLGDQASISCRSSQSLVHTYGATYLEWYLLKPGQSPILLIYKVSKRF 60
      *****:*:*:*.* :*: :*:~*~* : .**.* ** . : ***: .*

```

```

34C10  SGVPVRFSGSGSGTDFSLTIDTMVAEDVATYCQQGSVIPYTFGGGTKLEIKR 109
31A8   SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQKDIATYFCQGHSLPWTFGAGTKLELKR 108
      ]
30C12M SGVPDRFSGSGSGTDFSVKISRVEAEDLGVYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKR 113
      **** *****:*:*~* : :*~*~*~* * * :*~*~*~*~*~*~*~*

```

## Leichte Kette:

```

31A8   DIELTQSPFSLASASLGDRVTISCRASQDISN----YLNWYQKPDGTVKLLIYYTSKLH 55
      ]
30C12M DIELTQTPVSLAVSLGDQASISCRSSQSLVHTYGATYLEWYLLKPGQSPILLIYKVSKRF 60
5T4    SIVMTQTPFLLVSAGDRVTITCKASQSVSN----DVAWYQKPGQSPTLLISYTSSRY 55
      .* :***~* * . * **~*~*~*~*~*~*~* : : ** ** . : *** .*. .

```

```

31A8   SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQKDIATYFCQGHSLPWTFGAGTKLELKR 108
      ]
30C12M SGVPDRFSGSGSGTDFSVKISRVEAEDLGVYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKR 113
5T4    AGVPDRFISGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK- 107
      :***~*~* *** **~*~*~*~*~*~*~* : :*~*~*~*~* * . * ***~*~*~*~*~*~*~*

```

Bild 23: Sequenzvergleich der exprimierten Klone Y34C10 und Y30C12M (mutiert) mit der Positivkontrolle Y31A8 bzw. dem Klon 5T4 [(vor Mutation) (Forsberg et al., 1997)] untereinander. In der leichten Kette des Fv Y30C12 sind die mutierten Aminosäuren hervorgehoben.

Ein unterschiedliches Expressionsniveau von Fv-Fragmenten ist unter anderem abhängig von dem verwendeten Expressionsstamm und dem Expressionsvektor. Bekanntermaßen ist auch die Sequenz der variablen Region der leichten und schweren Kette von entscheidender Bedeutung (Ostermeier, 1995). Ausgehend von dieser Kenntnis wurden die Sequenzen von

Y30C12, Y34C10, 5T4 (Forsberg et al., 1997) und Y31A8 verglichen. Bei den Klonen Y30C12 und 5T4 konnte durch Punktmutationen in der leichten Kette eine Expressionssteigerung in *Escherichia coli* erreicht werden. Bei dem Klon Y30C12-M war diese für Bindungsversuche mit dem Antigen (Komplex I) dennoch nicht ausreichend. In der Sequenz von dem gut exprimierbaren Y31A8 befinden sich an Position 10 (Serin) und 77 (Serin) der leichten Kette bereits die Aminosäuren, die bei den anderen beiden Klonen in einem zusätzlichen Arbeitsschritt zunächst eingefügt werden mussten. Da sich bei den Klonen Y31A8 und Y34C10 an Position 78 Leucin befindet, könnte eine alleinige Punktmutation bei dem Klon Y30C12 an Position 77 versucht werden, da auch bei diesem Leucin an Position 78 vorkommt. Bei dem Sequenzvergleich der leichten Kette fiel ein Einschub in der Sequenz von Y34C10 sowie ein Einschub mehrerer Aminosäuren in der Sequenz von Y30C12-M auf, die in der CDR1 Region lokalisiert sind (Bild 23). Der Einschub innerhalb der CDR-Region wäre ein möglicher Erklärungsansatz hinsichtlich der unzureichenden Expression von Y30C12-M. Eine Mutation wäre in diesem Bereich wahrscheinlich nur mit einem Verlust an Bindungseigenschaften zu realisieren.

Bei den Klonen Y30C12-M und Y34C10 scheint hinsichtlich der Western-Blot Ergebnisse (siehe unter 3.2.4, Bild 9...11, sowie unter 3.4, Bild 14,15) auch die schwere Kette das Expressionsniveau zu limitieren. Daher könnte in weitergehenden Versuchen eine Punktmutation an Position 71 (rot unterlegt in Bild 23) der schweren Kette von Isoleucin (Y30C12-M) und Alanin (Y34C10) im Austausch gegen Tyrosin durchgeführt werden. An dieser Position innerhalb der „framework“-Region differieren die Aminosäuren der schlecht zu exprimierenden Klone Y30C12-M und Y34C10 von Tyrosin bei Y31A8 und 5T4. Die Abweichung der Aminosäuren innerhalb der Sequenz von den Klonen Y30C12-M und Y34C10 zu den gut exprimierbaren Klonen Y31A8 und 5T4, ist nur an dieser Stelle gegeben. An den Positionen 19, 29, 84 und 99 gibt es weitere Abweichungen innerhalb der „frameworks“ der schweren Kette von Y30C12-M und Y34C10 im Vergleich zu dem als Positivkontrolle eingesetzten Y31A8 (grün unterlegt in Bild 23).

#### 4.4 Kristallisation von Membranproteinen

Die ohnehin komplizierte Kristallisation von Membranproteinen wird bei Komplex I durch die große Masse von 1 MDa und die L-förmige Anordnung der Untereinheiten zusätzlich erschwert. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Struktur von Komplex I eine signifikante Flexibilität aufweist.

Eine relativ häufig angewandte Strategie zur Membranproteinkristallisation, ist die Kristallisation nur des löslichen Anteils des Proteins, welcher durch Abspaltung mittels

Proteasen, Detergenzbehandlung oder der rekombinanten Expression nur des löslichen Anteils zu erhalten ist (Abrahams et al., 1994; Hinchliffe and Sazanov, 2005). Dieses Konzept lässt sich für die NADH:Oxidoreduktase nur unter Informationsverlust realisieren, da sich katalytisch wichtige Bereiche in dem hydrophoben Anteil des Membranproteins befinden. Allerdings bietet diese Methode eine Alternative zur Kristallisation des offensichtlich beweglichen Komplex I. Mit etwa der Hälfte der Molmasse stellt das dann hydrophile Protein ein einfacheres System zur Kristallisation dar. Ein entsprechender Ansatz wurde bereits erfolgreich bei der hydrophilen Domäne der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase angewandt (Hinchliffe and Sazanov, 2005).

Mit der Zielsetzung das gesamte Protein (Komplex I) zu kristallisieren, wurden Antikörperfragmente als Hilfsmittel verwendet. Dieses Konzept ist aus vorangegangenen Arbeiten bekannt (Ostermeier et al., 1995; Hunte et al., 2000; Zhou et al., 2001). Die eingesetzten Fv- oder Fab-Fragmente vergrößern die hydrophile Oberfläche des Proteins und können Einfluss auf die Stabilisierung der nativen Struktur des Proteins oder bei essentiellen Kristallkontakten haben. Das erweist sich als nützlich, da hydrophobe Kontakte das Kristallgitter nur unzureichend stabilisieren. Weitere Vorteile bei der Verwendung von Antikörperfragmenten zur Ko-Kristallisation könnten beinhalten, dass durch die Bindung konformelle Zustände stabilisiert werden und Untereinheiten zusammengehalten werden.

Die Kristallisationsbedingungen müssen für jedes Protein empirisch ermittelt werden (McPherson, 1990). Für Komplex I aus *Y. lipolytica* konnten die Bedingungen in vorangehenden Studien eingegrenzt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Kristallisationsversuche durchgeführt. In dieser Arbeit konnten unter diesen Bedingungen keine Kristalle von dem Ko-Komplex der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase mit gebundenem Antikörperfragment des Klones Y34C10 erhalten werden. Es wurden lediglich Präzipitate in den bei 18°C inkubierten Proteinlösungen beobachtet (Tab. 6 unter 3.6.1).

Bei weiteren Versuchen mit diesem Ko-Komplex sollten die Kristallisationsbedingungen verändert werden, zumal mittlerweile Komplex I ohne gebundenes Antikörperfragment unter anderen Bedingungen als in dieser Arbeit angewandt, kristallisiert wird. Alternativ sollte ein völlig neues screening für den von FvY34C10 gebundenen Komplex I angestrebt werden.

## 5 Anhang

### 5.1 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	Bromochloroindolylphosphat
bp	Basenpaare
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	Complementary Determining Regions
cmc	critical micelle concentration
c-myc-Tag	Affinitätsmarker, C-terminal an der leichten Ketten des Antikörperfragmentes
CPEO	chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Proteinkette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemical Luminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
$E_m$	Mittelpunktsredoxpotential
EM	Elektronenmikroskop(isch)
Fab-Fragment	Umfasst VL, VH, CL, und CH1 Domäne, bindet
Antigen	
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid, reduziert
Fc-Fragment	Umfasst CH2 und CH3 Domäne, bindet kein Antigen, vermittelt Effektorfunktionen des Antikörpers
FeS	Eisen-Schwefel-Zentrum
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Fv-Fragment	Antigenbindende Domäne eines Antikörpers bestehend aus VL und VH

h	Stunde(n)
HAR	Hexaminruthenium (III)- chlorid
Hepes	N-[Hydroxyethyl-N`-(2-ethansulfonsäure)]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ig(A, D, E, G, M)	Immunglobulin (A, D, E, G, M)
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
l	Liter
LHON	Lebersche hereditäre Opticusneuroretinopathie
LK	Leichte Kette
LM	Laurylmaltosid
MELAS	Myopathie, Encephalopathie, Laktatazidose, stroke like episodes
MERRF	Myoklonus-Epilepsie mit "ragged red fibres"
MNGIE	Mitochondriale Neuropathie, gastrointestinale Störungen, Encephalopathie
Mops	$\gamma$ -Morpholino-ethansulfonsäure
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
MUT	Mutierter Klon
NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nikotinsäureamidadenindinukleotid, reduziert
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa
NBT	Nitrobluetetrazolin
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
nDNA	nukleäre DNA
N-Terminus	Amino-Terminus einer Proteinkette
OD	Optische Dichte
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	Plaques forming units = Anzahl der Phagen
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
P <sub>i</sub>	Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid

Q	Ubichinon
QH <sub>2</sub>	Ubihydrochinon
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sc-Fv	single-chain-Fv-Fragment
SK	Schwere Kette
Strep-Tag	Affinitätsmarker bestehend aus den Aminosäuren AlaTrpArgHisProGlnPheGlyGly; C-terminal an der schweren Kette des Antikörperfragmentes
TAE	Tris-EDTA-Acetat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Tricin	N-tris(hydroxymethyl)methylglycerin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (μmol/min)
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
VH	Variabler Teil der schweren Kette
VL	Variabler Teil der leichten Kette
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

## 5.2 Verzeichnis der Abbildungen

Bild 1:	Topologisches Schema des mitochondrialen Protonen- und Elektronentransportes von <i>Y. lipolytica</i>
Bild 2:	EM-Darstellungen und 3D-Modelle vom Komplex I
Bild 3:	L-förmig konfigurierter Komplex I
Bild 4:	Varianten dreidimensionaler Kristalltypen von Membranproteinen
Bild 5:	Darstellung eines bivalenten IgG-Antikörpers und abgeleitete Antikörperfragmente

- Bild 6: Schematische Übersicht der Klonierungsregion des Plasmides pASK68
- Bild 7: Y30C12, Präparatives Gel mit Abbildung der PCR-Produkte
- Bild 8: Proteinsequenz VH und VL des Fv-Fragmentes des Klonen Y30C12 in pASK68
- Bild 9: Strep-Tag-Nachweis; Y30C12, SLK<sub>1</sub>-pASK68; Vergleich nativ-mutiert
- Bild 10: c-myc-Tag-Nachweis; Y30C12, SLK<sub>1</sub>-pASK68-nativ
- Bild 11: c-myc-Tag-Nachweis; Y30C12, SLK-Mut-pASK68
- Bild 12: Y34C10, Präparatives Bild mit Abbildung der PCR-Produkte
- Bild 13: Proteinsequenz von VH und VL des Klonen Y34C10 in pASK68
- Bild 14: Strep-Tag-Nachweis; Y34C10, SLK-pASK68
- Bild 15: ECL-Immunoblot; Y34C10, SLK-pASK68
- Bild 16: 4/10 SDS-Gel, gereinigte Fv`s von Y34C10
- Bild 17: FPLC-Gelfiltration einer Mischung aus Komplex I und Fv-Fragment Y34C10
- Bild 18: SDS-Gel (4/16), Y34C10; Komplex I, Fv-Fragmente und gebundene Fv`s in verschiedenen Konzentrationen
- Bild 19: Y34C10, Nachweis des Strep-Tag vor und nach Gelfiltration zur Kontrolle der Bindungsfähigkeit der gewonnenen Fv`s an Komplex I
- Bild 20: Zweidimensionale Darstellung von FvY30C12- gebundenen Komplex I
- Bild 21: Zweidimensionale Darstellung von FvY34C10- gebundenen Komplex I
- Bild 22: Schematische Repräsentation der 49 kDa-Untereinheit in seiner Position mit gebundenem Antikörper Y34C10
- Bild 23: Sequenzvergleich der exprimierten Klone mit Positivkontrolle
- Bild 24: Ausschnitt der TA-Vektor Sequenz
- Bild 25: Schematische Darstellung des Plasmids pASK68
- Bild 26: Sequenz der Klonierungsregion des Klonierungs- und Expressionsvektors pASK68



### 5.3 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Die Enzymkomplexe der Atmungskette
Tabelle 2:	Konservierte Untereinheiten des Komplexes I von <i>Y. lipolytica</i>
Tabelle 3:	Kristallisationsplatte mit variierten Bedingungen / Well
Tabelle 4:	Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme
Tabelle 5:	Verwendete Plasmide
Tabelle 6:	Kristallisationsansätze unter verschiedenen Bedingungen mit Ergebnissen
Tabelle 7:	Mögliche Symptome verschiedener Organsysteme bei defekter Atmungskette
Tabelle 8:	Klinische Symptome und Syndrome assoziiert mit spezifischen Komplex-Defekten

### 5.4 Sequenzvergleich der 49 kDa Untereinheit aus verschiedenen Organismen

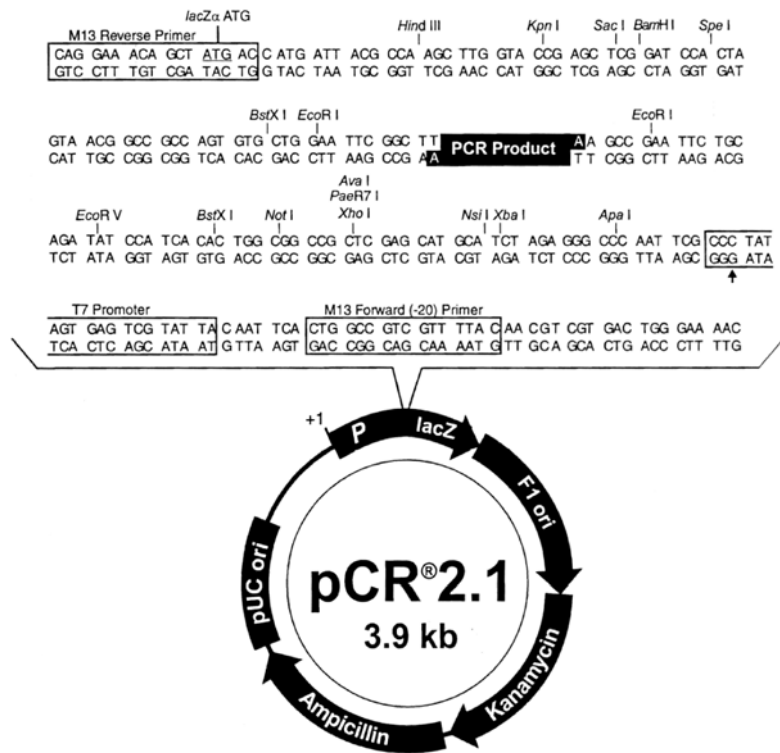
<i>Y. lipolytica</i>	~~~~~	~~MLRSAAAR	AVRAVRPRLS	ARYMATTALP	QDPIPSGALG
<i>B. taurus</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~AR
<i>N. crassa</i>	MATTLFRLAG	RNAKRHCMRQ	STTIAHNLNS	TRAFSASALR	RYAEPS.YEG
<i>Rh. capsulatus</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>E. coli</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51				100
<i>Y. lipolytica</i>	QKVPHVDESH	QDLLFRTSHM	VEDLETYDED	.SPINTSDAN	TRIRAFTINF
<i>B. taurus</i>	QWQPDVEWAE	QYGGAVMYPT	KETAHWKPPP	WNDVDP.PKD	TLVSNLTLNF
<i>N. crassa</i>	QGTRLVPTGD	DFAPNNDLYG	LEALKADGAP	RVPPQDHILA	RKVRHYTVNF
<i>Rh. capsulatus</i>	~~~~~	~~~~~M	DGDIRHNSYD	DGSEDVLTGE	QSIRNFNINF
<i>E. coli</i>	~~~~~	~~~~~	MEALTFKPEE	WGMKRG..T	ENEDFMFLNL
	101				150
<i>Y. lipolytica</i>	GPQHAAHGV	LRLILELSGE	EIIRSDPHVG	LLHRGTEKLI	EYKTYMQALP
<i>B. taurus</i>	GPQHAAHGV	LRLVMELSGE	MVRKCDPHIG	LLHRGTEKLI	EYKTYLQALP
<i>N. crassa</i>	GPQHAAHGV	LRLILELKGE	EIVRADPHVG	LLHRGTEKLC	EYRTYLQALP
<i>Rh. capsulatus</i>	GPQHAAHGV	LRMVLELDGE	IVERADPHIG	LLHRGTEKLM	ESRTYLQNTP
<i>E. coli</i>	GNHPSAHGA	FRIVLQLDGE	EIVDCVPDIG	YHHRGAEKMG	ERQSWHSYIP
	151				200
<i>Y. lipolytica</i>	YFDRLDYVSM	MTNEQVFSLA	VEKLLNVEVP	LRGKYIRTMF	GEITRVLNHL
<i>B. taurus</i>	YFDRLDYVSM	MCNEQAYSLA	VEKLLNIRPP	PRAQWIRVLF	GEITRLLNHI
<i>N. crassa</i>	YFDRLDYVSM	MTNEQCFALA	VEKLLNVEIP	ERAKWIRTMF	AEITRILNHL
<i>Rh. capsulatus</i>	YFDRLDYVAP	MNQEHAWCLA	IEKLTGTAVP	RRASIRVLF	SEIGRILNHL
<i>E. coli</i>	YTDRIEYLG	CVNEMPYVLA	VEKLAGITVP	DRVNVIRVML	SELFRINSHL
	201				250
<i>Y. lipolytica</i>	MSVCSHAMDV	GALTPFLWGF	EEREKLMIFY	ERVSGARLHA	AYVRPGGVSQ
<i>B. taurus</i>	MAVTTHALDI	GAMTPFFWMF	EEREKMFIFY	ERVSGARMHA	AYVRPGGVHQ
<i>N. crassa</i>	MSVLSHAMDV	GALTPFLWGF	EEREKLMIFY	ERVSGARLHA	AYVRPGGVHQ
<i>Rh. capsulatus</i>	LNVTQAMDV	GALTPPLWGF	EEREKLMIFY	ERACGARLHA	NYFRPGGVHQ
<i>E. coli</i>	LYISTFIQDV	GAMTPVFFAF	TDRQKIYDLV	EAITGFRMHP	AWFRIGGVAH
	251				300
<i>Y. lipolytica</i>	DLPAGLLDDI	YMWATQFGDR	LDEIEELLTD	NRIWKLRTVN	IGTVTAQDAL
<i>B. taurus</i>	DLPLGLMDDI	YEFSKNFSLR	IDELEEMLTN	NRIWRNRTVD	IGIVTAEDAL
<i>N. crassa</i>	DIPGLLDDI	YMWATQFGDR	IDETEEMLTN	NRIWIDRLRG	IGVVAADAL
<i>Rh. capsulatus</i>	DLPPDLDDI	EIWAKAFPQV	LDDIEGLLTE	NRIFKQRNAD	ICIITEAEIE
<i>E. coli</i>	DLPRGWDRLL	REFLDWMPKR	LASYEKAALQ	NTILKGRSQG	VAAYGAKEAL
	301				350
<i>Y. lipolytica</i>	NLGLSGPMLR	GSGIPFDIRK	NAPYDAYDKV	DFDVPVGM.N	GDCYDRYLIR
<i>B. taurus</i>	NYGFSGVMLR	GSGIQWDLRK	TQPYDVYDQV	EFDVPIGS.R	GDCYDRYLCR
<i>N. crassa</i>	NLSFTGVMLR	GSGVPWDIRK	SQPYDAYDQV	EFDVPVGI.N	GDCYDRYLCR
<i>Rh. capsulatus</i>	KWGYSGVMR	GSGLAWDLRR	AQPYECYDEF	DFKVAVGK.N	GDCYDRYLVR
<i>E. coli</i>	EWGTTGAGLR	ATGIDFDVRK	ARPYSGYENF	DFEIPVGGGV	SDCYTRVMLK

	351			400
<i>Y. lipolytica</i>	MAEFRQSLRI	IEQCCNDMPA	..GA.VKVED	FKINSPPRNL MKEDMEALIH
<i>B. taurus</i>	VEEMRQSIRI	ISQCLNKMP	..GE.IKVDD	AKVSPPKRAE MKTSMESLIH
<i>N. crassa</i>	MEEFRQSLRI	IHQCLNKMPA	..GP.VRVED	YKISPPPSA MKENMEALIH
<i>Rh. capsulatus</i>	MAEMRESTKI	ILQACAKLRA	PDGQGDILAR	GKLTTPPKRAE MKTSMEALIH
<i>E. coli</i>	VEELRQSLRI	LEQCLNNMPE	..GP.FKADH	PLTTPPKER TLQHITLIT
	401			450
<i>Y. lipolytica</i>	HFLLYTKGYS	VPPGETYTAI	EAPKGEMGVY	VVSDGSRPY KCKIRAPGFA
<i>B. taurus</i>	HFKLYTEGYQ	VPPGATYTAI	EAPKGEFGVY	LVSDGSSRPY RCKIKAPGFA
<i>N. crassa</i>	HFLLYTKGYA	VPPGDTYSAI	EGPKGEMGVY	VVSDGSRPY RVHIRAPGFA
<i>Rh. capsulatus</i>	HFKLYTEGFK	VPAGEVYAAV	EAPKGEFGVY	LVADGTNKPY RAKIRAPGYA
<i>E. coli</i>	HFLQVSWGVP	MPANESFQMI	EATKGINSYY	LTS DGSTMSY RTRVRTPSFA
	451			483
<i>Y. lipolytica</i>	HLGAFDHIAR	GHFLPDAVAI	IGTMDLVFGE	VDR
<i>B. taurus</i>	HLAGLDKMSK	GHMLADVVAI	IGTQDIVFGE	VDR
<i>N. crassa</i>	HLGGFDHLR	GHMLADAVAV	IGTMDLVFGE	VDR
<i>Rh. capsulatus</i>	HLQSIDAVAK	GHQLADVSAI	IGTMDVVFGE	IDR
<i>E. coli</i>	HLQQIPAAIR	GSLVSDLIVY	LGSIDFVMSD	VDR

### 5.5 Darstellung des Vektor pCR2.1

Bild 24: Ausschnitt der Sequenz des TA-Vektors dargestellt (insgesamt 3929 Nukleotide).

Der Pfeil zeigt auf den Start der Transkription für die T7 RNA Polymerase.



### 5.6 Schema und Sequenz des Plasmides pASK68

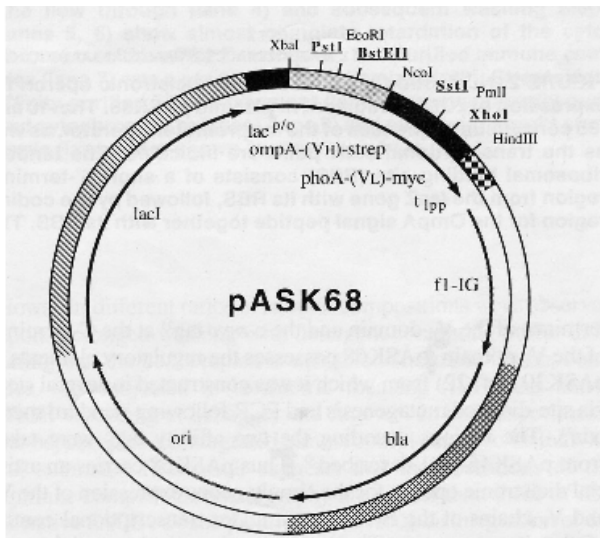


Bild 25: Schematische Darstellung des Plasmids pASK68. Dieser Klonierungs- und Expressionsvektor wurde für die bakterielle Produktion von Fv-Fragmenten verwendet. Zu beachten ist die Lage der Schnittstellen für V<sub>H</sub> (PstI, BstEII) und V<sub>L</sub> (SstI, XhoI).

1257

AGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTTCTAGATAAC  
TCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCTTTTGTGCGATACTGGTACTAATGCTTAAAGATCTATTG

GAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTA  
CTCCCCTTTTTTACTTTTTCTGTGCGATAGCGCTAACGTCACCGTGACCGACCAAAGCGAT

G Q K M K K T A I A I A V A L A G F A T  
OmpA-Sequenz

CCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGCAGGAATTCGGTCAACCGTCTCCTCAGCGTGGAGG  
Pst I BstE II

GGCATCGCGTCCGGCTTCAATTTGACGTCCTTAAGCCAGTGGCAGAGGAGTGCACCTCC  
V A Q A E V K L Q E F G H R L L S V E A

P \* R R P K L N C R N S V T V S S A W R  
OmpA N-Terminus VH C -Terminus VH mit Strep-Tag

-----VH-----

CATCCACAGTTCGGAGGCTAATAACCATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACTATTGC  
GTAGGTGTCAAGCCTCCGATTATTGGTACCTCTTTTATTTCACTTTGTTTCGTGATAACG

I H S S E A N N H G E N K V K Q S T I A  
H P Q F G G \* \* P W R K \* S E T K H Y C

Strep-Tag

PhoA-Sequenz

ACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACCCA  
Sst I

TGACCGTGAGAATGGCAATGACAAATGGGGACACTGTTTTCGGCTGTAGCTCGAGTGGGT  
L A L L P L L F T P V T K A D I E L T H

PhoA-Sequenz

N-Terminus VL

-----VL--

CGTGCTCGAGATCAAACGGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTAATAATG  
Xho I

GCACGAGCTCTAGTTTGGCCCTTGTTTTTGAGTAGAGTCTTCTCCTAGACTTAATTATTAC  
V L E I K R E Q K L I S E E D L N \* \* \*

C-Terminus VL mit

c-myc-Tag

--VL---

ATCTAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTGTCTG  
TAGATTGCAACTGGACACTTCACTTTTTTACCGCGTGTAACACGCTGTAAAAAAAACAGAC

CCGTTTACCGCTACTGCG

GGCAAATGGCGATGACGC 1694

Bild 26: Sequenz der Klonierungsregion des Klonierungs- und Expressionsvektors pASK68.

In der Sequenz sind die für die Klonierung und Umklonierung verwendeten Schnittstellen (BstE II, Pst I, für die schwere Kette und Sac I, Xho I für die leichte Kette) angegeben, sowie die Affinitätstags (c-myc-Tag, Strep-Tag) am C-Terminus und die Signalsequenzen (OmpA, PhoA).

Das Plasmid kodiert die ersten und letzten vier Aminosäuren der schweren Kette, sowie die ersten vier und letzten fünf Aminosäuren der leichten Kette ( $\kappa$ -Subtyp).

## 5.7 Atmungskettendefekte unter klinischen Aspekten

5.7.1 *Tabelle 7: Mögliche Symptome verschiedener Organsysteme bei defekter Atmungskette (Elle, 2005)*

<b>ZNS</b>	<b>Neuromuskulär</b>	<b>Renal</b>
Ataxie	Dystonie	Glomerulopathie
Demenz	Infantile Hypotonie	Bartter Syndrom
Depression	Spät beginnende Myopathie	Fanconi Syndrom
Psychosen	Myalgie	
Leukodystrophie	Neuropathie	<b>Dermal</b>
Migräne	Spastische Paraparese	Akrozyanose
Myoklonus	Schwäche	Hypertrichose
Parkinsonismus	Ptoisis	Pigmentierungsstörungen
Ermüdbarkeit		Alopezie
Psychomot. Retardierung	<b>Ophthalmologisch</b>	Pruritus
Epileptische Anfälle	Katarakt	
Sensoneurale Taubheit	Externale Ophthalmoplegie	<b>Endokrinologisch</b>
Schlaganfall	Optikus-Neuropathie	Struma
Schwindel	Retinopathie	Nebenniereninsuffizienz
	Makuladegeneration	Hypoparathyroidismus
<b>Hepatisch</b>	Nystagmus	Diabetes mellitus
Aplastische Anämie		Hypothyroidismus
Sideroblastische Anämie	<b>Gastrointestinal</b>	Ovarielle Dysfunktion
Aszites	Zyklisches Erbrechen	
	Hepathopathie	<b>Neoplastisch</b>
<b>Kardiologisch</b>	Intestinale Dysmotilität	Hereditäres Paragangliom
Kardiomyopathie	Exokrine Pankreas-	Symmetrische Lipomatosis
Leitungsstörungen	Dysfunktion	

5.7.2 *Tabelle 8: Klinische Symptome und Syndrome in Zusammenhang mit spezifischen Komplex-Defekten (Elle, 2005)*

<b>Komplex I</b>	<b>Komplex II</b>	<b>Komplex III</b>
Kardiomyopathie Katarakt Demenz Hepatopathie KSS Leigh Syndrom Fatal infantile Enzephalomyopathie Leukodystrophie LHON MELAS Myoklonische Epilepsie Neonatale Laktatazidose Pearson Syndrom Renale Tubulopathie	Ataxie Sportintoleranz Hereditäres Paragangliom Leigh Syndrom Myalgie Rhabdomyolyse KSS Optikusatrophie Hypertrophische Kardiomyopathie	Enzephalopathie Histozytoide Kardiomyopathie KSS MELAS CPEO Renale Tubulopathie Sportintoleranz Laktatazidose Fatal infantile Enzephalomyopathie
<b>Komplex IV</b>	<b>Komplex V</b>	<b>Komplex I-III, II-III oder Coenzym Q<sub>10</sub></b>
Alpers Syndrom Infantile Enzephalomyopathie Fatale Form Benigne Form KSS Leigh Syndrom MELAS MERRF MNGIE Multiple symmetrische Lipomatosis CPEO Renaler tubulärer Defekt	Leigh Syndrom NARP  <b>Komplex I + IV</b>  Ataxie Taubheit Demenz KSS Fatale infantile Enzephalomyopathie MERRF MELAS Myoklonus Retinopathie	Ataxie Zerebellare Hypoplasie Enzephalopathie Sportintoleranz Laktatazidose Myoglobinurie CPEO Ptosis Epileptischer Anfall Schwäche





## 6 Literaturverzeichnis

Abdrakhmanova et al., 2004; Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schägger, H., Kerscher, S., Brandt, U., "Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*." *Biochim. Biophys. Acta*, 1658: 148-156

Abrahams et al., 1994; Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E., "Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature*, 370: 621-628

Adams et al., 1998 ; Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Crawford, R.S., Wolf, E.J., Weiner, L.M., Marks, J.D., "Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu." *Br J Cancer*, 77: 1405-1412

Ahlers et al., 2000a; Ahlers, P., Zwicker, K., Kerscher, S., Brandt, U., "A Function of conserved acidic residues in the PSST-homologue of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) from *Y. lipolytica*." *J. Biol. Chem.*, 275: 23577-23582

Ahlers et al., 2000b; Ahlers, P., Garofano, A., Kerscher, S., Brandt, U., "Application of the obligate aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* as a eucaryotic model to analyse Leigh Syndrome mutations in the complex I core subunits PSST and TYKY." *Biochim. Biophys. Acta*, 1459: 258-265

Alfthan et al., 1995; Alfthan, K., Takkinen, K., Sizmann, D., Söderlund, H., Teeri, T., "Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides." *Protein Eng.*, 8: 725-731

Atwell et al., 1999; Atwell, J.L., Breheney, K.A., Lawrence, L.J., McCoy, A.J., Kortt, A.A., Hudson, P.J., "scFv multimers of the anti-neuramidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies." *Protein Eng.*, 12: 597-604

Ausubel et al., 2000 ; Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Current protocols in molecular biology, New York.

Barth und Gaillardin, 1997; Barth, G., Gaillardin, C., "Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*." *FEMS Microbiology Reviews*, 19: 219-237

Bird et al., 1988; Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufmann, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., "Single chain antigen-binding proteins", *Science*, 242: 423-426

- Bird, R.E., and Walker, B.W., 1991; "Single chain antibody variable regions." *Trends Biotechnol.*, 9 (4): 132-137
- Böttcher et al., 2002; Böttcher, B., Scheide, D., Hesterberg, M., Nagel-Steger, L., Friedrich, T., „A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I).” *J. Biol. Chem.*, 277: 17970-17977
- Boyer et al, 1977; Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., Slater, E.C., "Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation." *Annu. Rev. Biochem.*, 46: 955- 1026
- Brandt, U., 1997; "Proton-translocating by membrane-bound NADH:ubichinone oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction." *Biochim. Biophys. Acta* 1318 : 79-91
- Brandt, U., 2006; „Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I)“, *Annu. Rev. Biochem.* 75: 69-92
- Brierley et al., 1998; Brierley, J.E., Johnson, A.M., Lightowers, R.N., James, O.F.W., Turnbull, D.M., "Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: Implications for the central nervous system an muscle", *Ann. Neurol.*, 43: 217-223
- Buchner, J., and Rudolph, R., 1991; "Renaturation, Purification and Characterization of Recombinant Fab-Fragments Produced in *Escherichia coli*." *Biotechnology*, 9: 157-162
- Colcher et al., 1990; Colcher, D., Bird, R., Roselli, M., Hardman, K.D., Johnson, S., Pope, S., Dodd, S.W., Pantoliano, M.W., Milenic, D.E., Schlom, J., "In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein." *J Natl Cancer Inst.*, 82: 1191-1197
- Dionisi-Vici et al., 1997; Dionisi-Vici, C., Ruitenbeek, W., Fariello, G., Bentlage, H., Wanders, R.J., Schagger, H., Bosman, C., Piantadosi, C., Sabetta, G., Bertini, E., "New family mitochondrial encephalopathy with macrocephaly, cardiomyopathy, and complex I deficiency." *Ann. Neurol.*, 42: 661-665
- Djafarzadeh et al., 2000; Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schägger, H., Brandt, U., "Biophysical and structural characterization of protontranslocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*." *Biochim. Biophys. Acta*, 1459: 230-238
- Dudkina et al., 2005; Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., Braun, H.-P., "Structure of mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III", *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 3225-3229

Elle, J.S., 2005; "Charakterisierung der Atmungskettenenzyme NADH-CoQ-Reduktase und Cytochrom-c-Oxidase in verschiedenen humanen Geweben und Darstellung ihrer Bedeutung bei Defekten", Ludwig-Maximilians-Universität, München

Evan et al., 1985; Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M. "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Mol. Cell.Biol.* 5, 3610-3616

Fan et al., 1992; Fan, Z.-C., Shan, L., Guddat, L.W., He, X.-M., Gray, W.R., Raison, R.L., Edmundson, A.B., "Three-dimensional Structure of an Fv from a Human IgM Immunglobulin", *J. Mol. Biol.*, 228: 188-207

Fearnley und Walker, 1992; Fearnley, I.M., Walker, J.E., "Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins." *Biochim Biophys Acta*, 1140: 105-135

Finel et al., 1994; Finel, M., Majander, A.S., Tyynelä, J., de Jong, A.M.P., Albracht, S.P.J., Wikström, M.K.F., "Isolation and Characterization of Subcomplexes of the Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I)." *Eur. J. Biochem.*, 226: 237-242

Forsberg et al., 1997; Forsberg, G., Forsgren, M., Jaki, M., Norin, M., Sterky, C., Enhörning, A., Larsson, K., Ericson, M., Björk, P., "Identification of framework residues in a secreted recombinant antibody fragment that control production level and localization in *Escherichia coli*." *The Journal of Biological Chemistry*, 272;19: 12430-12436

Friedrich et al., 1995; Friedreich, T., Steinmüller, K., Weiss, H., "Minireview: The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts." *FEBS Lett.*, 367: 107-111

Friedrich und Weiss, 1997; Friedrich, T., Weiss, H., "Modular Evolution of the Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase and the Origin of its Modules." *J. theor. Biol.*, 187: 529-540

Friedrich, T., 1998; "The NADH:ubichinon oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta*, 1364: 134-146

Fuchs et al., 1997; Fuchs, P., Breitling, F., Little, M., Dubel, S., "Primary structure and functional scFv antibody expression of an antibody against the human protooncogen c-myc." *Hybridoma*, 16 (3): 227-233

Galante und Hatefi, 1978; Galante, Y.M., Hatefi, Y., "Resolution of complex I and isolation of NADH dehydrogenase and an iron-sulphur protein." *Methods Enzymol.*, 53: 15-21

Galante und Hatefi, 1979; Galante, Y.M., Hatefi, Y., "Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH dehydrogenase." *Arch. Biochem. Biophys.*, 192: 559-568

Glockshuber et al., 1992; Glockshuber, R., Schmidt, T., Plückthun, A., "The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro and functional expression in *Escherichia coli*." *Biochemistry*, 31: 1270-1279

Grigorieff, 1998; Grigorieff, N., "Three-dimensional Structure of Bovine NADH:ubichinone oxidoreductase (Complex I) at 22 Å in Ice." *J. Mol. Biol.*, 277: 1033-1046

Grigorieff, 1999; Grigorieff, N., "Structure of the respiratory NADH:ubichinone oxidoreductase (complex I)." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 476-483

Green, N.M. (1975). Avidin. *Advan. Protein Chem.* 29, 85-133

Guènebaut et al., 1997; Guenebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H., Leonard, K.R., "Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction." *J. Mol. Biol.*, 265: 409-418

Guènebaut et al., 1998; Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., Friedrich, T., "Consistent Structure Between Bacterial and Mitochondrial NADH:Ubichinon Oxidoreductase (Complex I)." *J. Mol. Biol.*, 276: 105-112

Hanahan, 1983; Hanahan, D.J., "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166; 557-580

Helenius und Simons, 1972; Helenius, A., Simons, K., "The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins." *J.Biol.Chem.* 247, 3656-3661

Hellwig, S., 2000; Dissertation; „Entwicklung von Fermentationsprozessen zur Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in *Pichia pastoris* und *Nicotiana tabacum*“, S.3, Rheinisch-Westfälische-Technische Hochschule, Aachen

Hinchliffe, P., and Sazanov, L., A., 2005; "Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I." *Science*, 309: 771-774

Hirst et al., 2003; Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Walker, J., "The nuklear encoded subunits of complex from bovine heart mitochondria." *Biochim Biophys Acta*, 1604: 135-150

- Hochman et al., 1973; Hochman, J., Inbar, D., Girol, D., "An active antibody fragment (Fv) composed of the variable portions of heavy and light chains." *Biochemistry*, 12: 1130-1135
- Hofhaus et al., 1991; Hofhaus, G., Weiss, H., Leonard, K., "Electron Microscopic Analysis of the Peripheral and Membrane Parts of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I)." *J. Mol. Biol.*, 221: 1027-1043
- Hoogenboom et al., 1991; Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G., "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: Methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." *Nucl. Acid Res.*, 19 (15): 4133-4137
- Huang et al., 2005; Huang, L.-S., Borders, T.M., Shen, J.T., Wang, C.-J., Berry, E.A., "Crystallization of Mitochondrial Respiratory Complex II from Chicken Heart: A Membrane-Protein Complex Diffracting to 2.0 Å", *Acta Crystallogr. D* 61, 380-387
- Hunte et al., 2000; Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmannith, T., Michel, H., "Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment" *Structure*, 8(6): 669-684
- Hunte, C., 2001; "Insights from the structure of the yeast cytochrome bc1 complex: crystallization of membrane proteins with antibody fragments." *FEBS Lett.*, 504 (3), 126-132
- Hunte and Michel, 2002; Hunte, C., Michel, H., "Crystallization of membrane proteins mediated by antibody fragments" *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 503-508
- Hunte et al., 2003; Hunte, C., von Jagow, G., Schägger, H., "Membrane Protein Purification and Crystallization", Academic Press (second edition), ISBN: 0-12-361776-6
- Huston et al., 1988 ; Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., et al., "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 5879-5883
- Inbar et al., 1972; Inbar, D., Hochman, J., Girol, D., "Localisation of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains." *Proc Natl Acad Sci USA*, 69: 2659-2662
- Iverson et al., 1999; Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G., Rees, D.C., "Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex." *Science*, 284: 1961-1966

- Iverson et al., 2002; Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Croal, L.R., Cecchini, G., Rees, D.C., "Crystallographic Studies of the *Escherichia coli* Quinol-Fumarate Reductase with Inhibitors Bound to the Quinol-binding site." *J. Biol. Chem.*, 277 : 16124-16130
- Iwata et al., 1995; Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H., "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Nature* 376: 660-669
- Jung, S., and Plückthun, A., 1997; "Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting." *Protein Eng.*, 10: 959-966
- Kashani-Poor et al., 2001(a); Kashani-Poor, N., Kerscher, S., Zickermann, V., Brandt, U., "Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*." *Biochim. Biophys. Acta*, 1504: 363-370
- Kashani-Poor et al., 2001; Kashani-Poor, N., Zwicker, K., Kerscher, S., Brandt, U., "A Central Functional Role for the 49- kDa Subunit within the Catalytic Core of Mitochondrial Complex I." *J. Biol. Chem.*, 276: 24082-24087
- Kabat et al., 1991; Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., Foeller, C., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> ed. NIH publication 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Kerscher et al., 1999; Kerscher, S., Okun, J.G., und Brandt, U., "A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*." *J. Cell. Sci.*, 112 (14): 2347-2354
- Kerscher et al., 2001; Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C., Brandt, U., "The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*." *Compar. Funct. Genom.*, 2: 80-90
- Kerscher et al., 2002; Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K., Zickermann, V., Brandt, U., "Yarrowia lipolytica, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I." *Biochim. Biophys. Acta*, 1555, 83-91
- Kipriyanov et al., 1997; Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Martin, A.C., Kupriyanova, O.A., Litle, M., "Two amino acid mutations in an anti-Human Cd3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." *Protein Eng.*, 10: 445-453

Kleymann et al., 1995; Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., Michel, H., "Engineered Fv fragments as a Tool for the One-Step Purification of Integral Multisubunit Membrane Protein Complexes." *BioTechnology*, 13: 155-160

Knappik, A., and Plückthun, A., 1995; "Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding." *Protein Eng.*, 8: 81-89

Lancaster et al., 1999; Lancaster, C.R., Kroger, A., Auer, M., Michel, H., "Structure of fumarate reductase from *Wolinella Succinogenes* at 2.2 resolution." *Nature* 1999, 402: 377-385.

Lancaster et al., 2001; Lancaster, C.R.D., Groß, R., Simon, J., "A third crystal form of *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase reveals domain closure at the site of fumarate reduction." *Eur. J. Biochem.*, 268: 1820-1827

Lange, C., und Hunte, C., 2002; "Crystal structure of the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex with its bound substrate cytochrome c." *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(5): 2800-2805

LaVallie et al., 1993; LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., McCoy, J.M., "A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm." *Biotechnology*, 11(2): 187-193

Legerski, R.J., and Robberson, D.L., 1985; "Analysis and optimization of recombinant DNA joining reactions." *J. Mol. Biol.*, 181 : 297-312

Leonard et al., 1987; Leonard, K., Haiker, H., Weiss, H., "Three-dimensional structure of NADH: ubiquinone reductase (complex I) from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals." *J. Mol. Biol.*, 194: 277-286

Lindner, P., et al., 1992; "Purification of Native Proteins from the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli* Using IMAC and Histidine Tails: A Comparison of Proteins and Protocols." *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 4: 41-56

Loeffen et al., 2000 ; Loeffen, J.L.C.M., Smeitink, J.A.M., Trijbels, J.M.F., Janssen, A.J.M., Triepels, R.H., Sengers, L.P., Van den Heuvel, L., "Isolated complex I deficiency in children: Clinical biochemical and genetic aspects." *Human Mutation* 15, 123-134

Löffler, Petrides, Löffler, G., Petrides, P.E., "Biochemie und Pathobiochemie", 6. Aufl., Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York), ISBN 3-540-64350-8

Lowry et al., 1951 ; Lowry, O.H., Rosebrough, N.R., Farr, A.L., Randall, R.J., "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

Mallender und Voss, 1994; Mallender, W.D., Voss, E.W., "Construction, expression and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody." *J Biol. Chem.*, 269: 199-206

Markwell et al., 1978 ; Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L., Tolbert, N.E., "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." *Anal. Biochem.* 87: 206-210

McPherson, A., 1990; "Current approaches to macromolecular crystallization." *Eur. J. Biochem.* 189, 1-23

Michel, H., 1983; "Crystallization of membrane proteins." *Trends Biochem Sci.*, 8: 56-59

Mikol et al., 1990; Mikol, D.D., Alexakos, M.J., Bayley, C.A., Lemons, R.S., LeBeau, M.M., Stefansson, K., "Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein." *J. Cell Biol.* 111: 2673-2679

Mitchell, 1966; Mitchell, P., "Chemiosmotic coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation." *Biol. Rev.* 41: 445-502

Morgan-Hughes, J.A., Hanna, M.G., 1999; "Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype." *Biochim Biophys Acta*, 1410: 125-145

Morris et al., 1996; Morris, A. A. M.; Leonard, J. V.; Brown, G. K.; Bidouki, S. K.; Bindoff, L. A.; Woodward, C. E.; Harding, A. E.; Lake, B. D.; Harding, B. N.; Farrell, M. A.; Bell, J. E.; Mirakhur, M.; Turnbull, D. M., "Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease." *Ann. Neurol.*, 40: 25-30,

Munro und Pelham, 1986; Munro, S., Pelham, H.R.B., "An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein." *Cell*, 46, 291-300

Nehls et al., 1992; Nehls, U., Friedrich, T., Schmiede, A., Ohnishi, T., Weiss, H., "Characterization of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora crassa* mitochondria by gene disruption." *J. Mol. Biol.*, 227: 1032-1042

Ostermeier, C., 1995; Dissertation: „Kristallisation des Membranproteinkomplexes Cytochrom-c-Oxidase mit Hilfe eines Fv-Fragmentes“, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Ostermeier et al., 1995; Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B., Michel, H., „Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase.“ *Nat. Struct. Biol.* 2: 842-846.



Ostermeier, C., and Michel, H., 1997; "Crystallization of membrane proteins." *Curr Opin Struct Biol.*, 7: 697-701

Ostermeier et al., 1997; Ostermeier, C., Harrenga, A., Ernler, U., Michel, H., "Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody Fv fragment." *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94: 10547-10553

Parham, P., 1986; Chapter 14, Immunochemistry. In: *Handbook of Experimental Immunology Blackwell Scientific Publication*, 1-23

Perisic et al., 1994; Perisic, O., Webb, P.A., Holliger, P., Winter, G., Williams, R.L., "Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment." *Structure*, 2: 1217-1226

Porter, 1959; Porter, R.R., "The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain." *Biochem. J.*, 73: 119-126

Proba et al., 1998; Proba, K., Wörn, A., Honegger, A., Plückthun, A., "Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution." *J. Mol. Biol.*, 275: 245-253

Radermacher et al., 2006; Radermacher, M., Ruiz, T., Clason, T., Benjamin, S., Brandt, U., Zickermann, V., "The three-dimensional structure of complex I from *Yarrowia lipolytica*: a highly dynamic enzyme", *J Struct Biol*, 154: 269-279

Rahman et al., 1996; Rahman, S., Blok, R.B., Dahl, H.H., Danks, D.M., Kirby, D.M., Chow, C.W., Christodoulou, J., Thornurn, D.R., "Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities." *Ann. Neurol.*, 39: 343-351

Robinson, 1998; Robinson, B.H., "Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect." *Biochim. Biophys. Acta*, 1364: 271-286

Sambrook et al., 1989; Sambrook, T., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour, New York

Savanov und Walker, 2000; Savanov, L.A., Walker, J.E., "Cryo-electron Crystallography of Two Subcomplexes of Bovine Complex I Reveals the Relationship between the Membrane and Peripheral Arms." *J. Mol. Biol.*, 302: 455-464

Schägger, H. and von Jagow, G., 1987; "Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton." *Anal.Biochem.* 166, 368-379

Schägger, 1994 in: von Jagow, G., Schägger, H. (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, pp. 23-57

Schägger, H., und Pfeiffer, K., 2000; "Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria." *EMBO J.*, 19: 1777-1783

Schapira, A.H., 1998; "Human complex I defects in neurodegenerative diseases." *Biochim. Biophys. Acta*, 1364: 261-270

Schertler, G.F.X., 1992; "Overproduction of membrane proteins." *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 534-544

Schmidt, T.G.M. und Skerra, A., 1993; "The random peptide library-assisted engineering of a C- terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment." *Protein Eng.* 6: 109-122.

Schmidt, T.G.M. und Skerra, A., 1994, "One- step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the „Strep tag“ and immobilized recombinant core streptavidin." *J. Chromatogr. sect. A*, 676: 337-345

Schulte et al., 1994; Schulte, U., Fecke, W., Krüll, C., Nehls, U., Schmiede, A., Schneider, R., Ohnishi, T., Weiss, H., "In Vivo Dissection of the Mitochondrial Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I)." *Biochim. Biophys. Acta*, 1187: 121-124

Schulte und Weiss, 1995; Schulte, U., Weiss, H., "Generation and characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase mutants in *Neurospora crassa*." *Meth. Enzymol.*, 260: 3-14

Schumann, D., 1996; *Diplomarbeit*: „Herstellung und Expression bispezifischer „single-chain“ Antikörper“, Rheinisch-Westfälische-Technische Hochschule, Aachen

Skehel, J.M., Fearnley, I.M., Walker, J.E., 1998; "NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria: sequence of a novel 17.2-kDa subunit." *FEBS Lett.*, 438: 301-305

Skerra, 1993; Skerra, A., "Bacterial expression of immunoglobulin fragments." *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262

Skerra und Plückthun, 1988; Skerra, A., Plückthun, A., „Assembly of a Functional Immunoglobulin Fv Fragment in *Escherichia coli*." *Science*, 240: 1038-1041

- Smeitink et al., 2004; Smeitink, J.A.M., van der Heuvel, L.W.P.J., Koopman, W.J.H., Nijtmans, L.G.J., Ugalde, C., Willems, P.H.G.M., "Cell Biological Consequences of Mitochondrial NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Deficiency." *Current Neurovascular Research*, 1: 29-40
- Stacpoole, P.W., 1997; "Lactat Acidosis and other Mitochondrial Disorders." *Metabolism*, 46 (3): 306-321
- Tang und Nakata, 1994; Tang, X., Nakata, Y., Li, H.O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokoyama, K., "The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*." *Nucl.Acids Res.* 22; 2857-2858
- Tanaka et al., 1996; Tanaka, K., Nagayama, Y., Yamasaki, H., Hayashi, H., Namba, H., Yamashita, S., Niwa, M., "Epitope-tagging of a functional thyrotropin receptor: detection of the native receptor on intact cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 228: 21-28
- Triepels et al., 2001; Triepels, R.H., van der Heuvel, L.P., Trijbels, J.M., Smeitink, J.A., „Respiratory chain complex I deficiency.“ *Am J Med Genet*, 106: 37-45
- Tsukihara et al., 1995; Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., "Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å." *Science*, 269: 1069-1074
- Tsukihara et al., 1996; Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." *Science*, 272: 1136-1144
- Tuschen et al., 1990; Tuschen, G., Sackmann, U., Nehls, U., Haiker, H., Buse, G., Weiss, H., "Assembly of NADH:Ubiquinone reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria." *J. Mol. Biol.*, 213: 845-857
- Venturi, M., and Hunte, C., 2003; "Monoclonal antibodies for the structural analysis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NhaA from *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta*, 1610: 46-50
- Walker, 1992; Walker, J.E.; "The NADH:ubichinon oxidoreductase (Complex I) of respiratory chains." *Quart. Rev. Biophys.* 25 (3); 253-324
- Wallace, C.D., 1992; "Diseases of the mitochondrial DNA." *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 1175-1212

- Wallin, 1998; Wallin, E., von-Heijne, G., "Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic-organisms." *Protein Science*, 7(4): 1029-1038
- Ward et al., 1993; Ward, V.K., Schneider, P.G., Kreissig, S.B., Hammock, B.D., Choundary, P.V., "Cloning, sequencing and expression of the Fab fragment of a monoclonal antibody to the herbicide atrazine." *Protein Eng.*, 6: 981-988
- Weidner et al., 1993; Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., "The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organisation of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I." *J. Mol. Biol.*, 233: 109-122
- Weiss et al., 1991; Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., Preis, D., "The respiratory-chain NADH-dehydrogenase (complex I) of mitochondria." *Eur J Biochem*; 197: 563-576
- Wiener, M.C., 2004; "A pedestrian guide to membrane protein crystallization." *Methods*, 34: 364-372
- Wikström, M.K.F., 1984; "Pumping of Protons from the Mitochondrial Matrix by Cytochrome Oxidase." *Nature*, 308: 558-560
- Wikström, M.K.F., 1984; "Two Protons Are Pumped From the Mitochondrial Matrix Per Electron Transferred Between NADH and Ubiquinone." *FEBS Lett*, 169: 300-304
- Winter und Milstein, 1991; Winter, G., Milstein, C., „Man-made antibodies.“ *Nature*, 349: 293-299
- Wu, T.T. and Kabat, E.A., 1970; "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity", *J. Exp. Med.* 132: 211-250
- Yankovskaya et al., 2003; Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Lèger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S., "Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation." *Science*, 299: 700-704
- Yu et al., 1997; Yu, C.-A., Xia, J.-Z., Kachurin, A.M., Yu, L., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., "Crystal structure of beef heart mitochondrial cytochrome-bc<sub>1</sub> complex." *Science*, 277: 60-66

Yu et al., 1999; Yu, C.A., Zhang, L., Deng, K.A., Tian, H., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., Yu, L., "Structure and reaction mechanisms of multifunctional cytochrom bc<sub>1</sub> complex." *Biofactors*, 9: 103-109

Zhang et al., 1998; Zhang, Z., Huang, L., Schulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.H., "Electrontransfer by domain movment in cytochrome bc<sub>1</sub>." *Nature*, 392: 677-684

Zhou et al., 1990; Zhou, C., Yang, Y., Jong, A.Y., Miniprep in ten minutes. *Biotechniques* 8: 172-173

Zhou et al., 2001 ; Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufmann, A., MacKinnon, R., "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 resolution ", *Nature*, 414: 43-48

Zickermann, V., 1996; Dissertation: „Untersuchung zur Struktur und Funktion des Cu<sub>A</sub>-Zentrums in der Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*“, Johann-Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Zickermann et al., 2003; Zickermann, V., Bostina, M., Hunte, C., Ruiz, T., Radermacher, M., Brandt, U., "Functional Implications from an Unexpected Position of the 49-kDa Subunit of NADH:Ubichinon Oxidoreductase." *J. Biol. Chem.*, 278 (31): 29072-29078

Zwicker et al., 2006; Zwicker, K., Galkin, A., Dröse, S., Grgic, L., Kerscher, S., Brandt, U., "The redox-Bohr group associated with iron-sulfur cluster N2 of complex I", *J. Biol. Chem.*, 281 (32): 23013-23017

## 7 Zusammenfassung

### 7.1 Zusammenfassung und Ausblick

Viele aerobe Organismen besitzen eine NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, ein Enzym, welches der Haupteintrittspunkt für Elektronen in die Atmungskette darstellt. An den Elektronentransfer ist die Protonentranslokation vom Zytosol in den Intermembranraum der Mitochondrien gekoppelt. Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels bedingen Mitochondriopathien. Der Befall verschiedener Organsysteme, v.a. denjenigen mit hohem Energiestoffwechsel (Gehirn, Skelettmuskel, Retina, Myokard), verursacht multiple Symptome, was für diese Erkrankungen bezeichnend ist.

Die Aufklärung der exakten Funktionsweise eines Enzyms bedarf der Kenntnis über seine räumliche Struktur. Diese lässt sich zur Zeit für ein Protein dieser Größe nur mittels Elektronenmikroskopie an zweidimensionalen Kristallen oder durch Röntgenkristallographie an dreidimensionalen Einkristallen realisieren.

Das Ziel und die Herausforderung dieser Arbeit galt der Kristallisation und Strukturanalyse der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, eines der größten Membranproteinkomplexe. Mit Hilfe der Kristallisation sollten Auskünfte über die Struktur und Rückschlüsse auf seine Funktion, sowie weitere Einblicke in die Bedeutung dieses Proteinkomplexes ermöglicht werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine L-förmige Struktur des Enzyms mit einem peripheren Arm, der in die mitochondriale Matrix ragt, und einem Membranarm, der in der Lipiddoppelschicht angeordnet ist. In beiden Armen befinden sich insgesamt bis zu 46 Untereinheiten des Enzymkomplexes. Die NADH-Bindungsstelle und alle bekannten Redoxgruppen (FMN, bis zu neun FeS-Zentren) liegen im peripheren Arm. Der Winkel zwischen beiden Armen ist variabel.

Mit dem Ziel Komplex I in seiner Gesamtheit zu kristallisieren, wurden Antikörperfragmente zur Ko-Kristallisation eingesetzt. Die Bedeutung der Fv-Fragmente, als kleinste antigenbindende Domäne eines Antikörpers, liegt in der Vergrößerung der hydrophilen Oberfläche. Es wurden Fv-Fragmente gegen die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase aus *Yarrowia lipolytica* erzeugt und ihre Eignung für die Kristallisation überprüft. Die Klonierung und Expression erfolgte in

*Escherichia coli*. Es zeigte sich durchweg nur ein sehr niedriges oder auch vollkommen unbefriedigendes Expressionsniveau der Fv-Fragmente. Nach gezielter Mutation konnte bei dem Klon Y30C12 eine Expressionssteigerung erreicht werden, welche allerdings für Kristallisationsversuche noch immer unzureichend war.

Mit dem Klon Y34C10 konnte in Expressionsversuchen eine ausreichende Menge an Fv-Fragmenten gewonnen werden. Mit diesen Fv-Fragmenten gelang auch die Einschrittreinigung an der Streptavidin-Sepharosesäule und es konnten Bindungs- und Kristallisationsversuche mit Komplex I unternommen werden. Durch eine FPLC-Gelfiltration konnte ein stöchiometrischer 1:1 Komplex aus der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und dem Fv-Fragment Y34C10 gewonnen werden, welcher bei der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen eingesetzt wurde.

Eine Kristallisation des Komplexes gelang unter den ausgewählten Bedingungen mit diesem Komplex jedoch noch nicht.

Dennoch eignen sich die Klone Y34C10 und Y30C12-M für weitere Studien, die eine Expressionssteigerung durch Punktmutationen in der schweren und leichten Kette (siehe unter 4.3) beinhalten sollten. Zum anderen besteht die Wahrscheinlichkeit den Kristallisationserfolg durch breite Variation der Bedingungen zu erhöhen.

Kommentar [B1]: Hmmmmm...

## 7.2 Abstract and Perspective

Many aerobic organisms contain NADH:ubiquinone oxidoreductase, the entry point for the major fraction of electrons that traverse the respiratory chain resulting eventually in the reduction of oxygen. (Coupled to the electron transfer, protons are pumped from the matrix side to the intermembrane space of mitochondria.) Disturbances of the mitochondrial energy-metabolism cause mitochondrial pathologies. Typical for these illnesses are dysfunction of organ systems with high energy-metabolism (brain, skeleton-muscle, retina, myocard).

Elucidating the catalytic mechanism of an enzyme requires knowledge of its three-dimensional structure. Presently, this can be realized for a protein of this size only by means of electron microscopy on two-dimensional crystals or by X-ray crystallography on three-dimensional crystals.

The generation of an electro-chemical potential gradient depends on transmembrane proton translocation, with the catalytic mechanism of action still being partly unknown; a deeper understanding of its function may be achieved by gaining additional information on the structure of this membrane protein. The challenging objective pursued in this study focuses on the crystallization and structural analysis of the NADH:ubiquinone oxidoreductase, one of the largest catalytic complexes known. The crystallization of this membrane protein, which is an essential component of the respiratory chain, may reveal additional information on its molecular structure and should also allow conclusive observations on its function and impact.

Electron microscopic images show an L-shaped structure of the enzyme with a peripheral arm, which protrudes into the mitochondrial matrix, and a membrane arm located in the lipid bilayer.

Both parts together are composed of up to 46 subunits. The NADH binding site and all well-known redox groups (FMN, up to nine FeS centers) reside in the peripheral arm. The angle between both arms is variable.

Fv fragments, being the smallest antigen-binding unit of an antibody were used to promote crystallization of the whole complex I. The main feature of these Fv fragments is in the enlargement of the hydrophilic surface, to increase crystallization probability. Fv fragments recognizing the NADH:ubiquinone oxidoreductase, isolated from *Yarrowia lipolytica*, were examined for their suitability for crystallization. Cloning and expression was done in *Escherichia coli*.



Upon characterization of the recombinant Fv clones, only a very low or an unsatisfactory expression level of Fv fragments was observed within all clones. After site directed mutagenesis of specific residues a larger quantity of Fv fragments could be expressed with clone Y30C12. However, the yield was still insufficient for the following crystallization assays.

By using clone Y34C10, we obtained a sufficient amount of Fv fragments in expression experiments. This Fv fragment could be successfully isolated in a one step purification on streptavidin sepharose. Following this, binding and crystallization assays with complex I were carried out. Using a FPLC gel filtration, a stoichiometric 1:1 complex of NADH:ubiquinone oxidoreductase and the Fv fragment Y34C10 was prepared, which was then used to look for suitable crystallization conditions. However, crystallization of the complex was not yet successful under the selected conditions.

Nevertheless, the clones Y34C10 and Y30C12-M are suitable for further studies that should comprise an increase of the expression level through point-mutations in the heavy and light chain (see under 4.3). Moreover, the likelihood to obtain crystals should increase by variation of the conditions or through a new screen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname	Werner, Juliane
Geburtstag	09.10.1979
Geburtsort	Ludwigslust
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig
Heimatanschrift	Beethovenstraße 28 60325 Frankfurt am Main

### Bildungsweg

Schulausbildung	1986-1992 Grund- und Gesamtschule, Parkschule Ludwigslust 1992-1997 Gymnasium, J.W.Goethe-Gymnasium Ludwigslust 1999 Abitur, Wilhelm-Ostwald-Gymnasium Leipzig
-----------------	---

### Medizinstudium

2000-2002	Vorklinischer Abschnitt, J. W. Goethe Universität Frankfurt / Main
2002-2006	Klinischer Abschnitt, J. W. Goethe Universität Frankfurt / Main
2002	Physikum
2003	1. Staatsexamen
2005	2. Staatsexamen
2006	3. Staatsexamen

Praktische Tätigkeit

2002-2004

Famulaturen:

Pathologie, Universitätsklinik Frankfurt a.M.

Innere Medizin, Nordwest KH, Frankfurt a.M.

Augenheilkunde, Universitätsklinik, Köln

Allgemeinmedizin / Innere Medizin, Praxis HN

2005-2006

Praktisches Jahr:

Neurologie, Nordwest KH, Frankfurt a.M.

Innere Medizin, St. Elisabethen Hospital, Frechen  
(Köln)

Chirurgie, Burgdorf (Schweiz)

ab 09/06

Assistenzärztin in der Inneren Medizin im  
Klinikum Darmstadt

18.10.2006

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Heterologe Expression von Antikörperfragmenten zur Kristallisation von Membranproteinen“

in dem Institut für Biochemie I – Molekulare Bioenergetik (komm. Leiter: Prof. Dr. Ulrich Brandt) am Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

unter Betreuung und Anleitung  
von Herrn Prof. Dr. U. Brandt

mit Unterstützung  
durch Herrn Dr. V. Zickermann

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, 18.10.2006